



UNIVERSIDADE DO VALE DO TAQUARI - UNIVATES  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA (PPGBiotec)

**ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE BACTÉRIAS EFICIENTES  
NA BIODEGRADAÇÃO DE CORANTES AZO SINTÉTICOS**

Cássio Schmidt

Lajeado, fevereiro de 2018

Cassio Schmidt

## **ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE BACTÉRIAS EFICIENTES NA BIODEGRADAÇÃO DE CORANTES AZO SINTÉTICOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, da Universidade do Vale do Taquari - Univates, como parte dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia, na Área de Concentração Detecção e Caracterização de Microrganismos.

Orientadora: Profa. Dra. Camille Eichelberger Granada

Coorientador: Prof. Dr. Raul Antonio Sperotto

Lajeado, fevereiro de 2018

Dedico este trabalho a toda a minha família e a todas aquelas pessoas especiais, que de alguma forma participaram deste momento da minha vida, dedicação em especial a Carine pelos momentos de apoio onde a caminhada esteve mais difícil e as minhas filhas dedico amor eterno.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço aos colegas de trabalho do Frigorífico Kroth pelo auxílio e compreensão nos momentos em que não estive presente em especial aos Srs. Luís Kroth e Alaércio Zanatta e também a Srta. Ângela Ribeiro que sempre me auxiliaram nos momentos em que estive na Univates e dedicaram seu tempo para executar as minhas tarefas diárias;

Agradeço ao pessoal da Xerox Center, principalmente ao Natan e a Júlia pela colaboração com as tabelas, gráficos, impressões de artigos e com as normas de trabalhos acadêmicos da Univates;

Agradeço aos bolsistas do laboratório de química, principalmente ao Gabriel pela ajuda e contribuição nos momentos das análises químicas;

Agradeço aos bolsistas do laboratório de biologia molecular, principalmente a Amanda e a Letícia pelo auxílio nas análises e nas corridas do gel de extração de DNA e nas etapas da PCR;

Agradeço ao professor Eduardo Ethur, pelo auxílio nas dúvidas com o roto-evaporador e pelos conselhos em relação aos metabólitos formados após a identificação pelo GC-MS;

Agradeço ao Vinicius e a Martha do Tecnovates pelo auxílio e disposição que tiveram para comigo;

Agradeço aos colegas de mestrado, pela ajuda e auxílio com a minha pessoa, que já não sentava em um banco de universidade a bastante tempo, agora eles deixam de serem colegas e se tornam amigos para a vida toda;

A todos os professores do PPGBiotec, pelo conhecimento, que de alguma forma contribuiu com o resultado deste trabalho;

E um agradecimento especial aos meus orientadores Camille e Raul pela compreensão, pelos ensinamentos, pela dedicação e apoio que tiveram comigo e todo o auxílio para conclusão deste trabalho de mestrado.

Muito obrigado!

## RESUMO

Os corantes azo são uma classe de corantes sintéticos com ampla variedade de cores e tons, que possuem as mais diversas aplicações na indústria. O corante amaranço é um corante azo usado na coloração de alimentos, e o vermelho congô é utilizado no tingimento de fibras têxteis. Ambos são de difícil degradação por métodos físico-químicos, e a biodegradação por bactérias é uma alternativa de fácil aplicação e ambientalmente segura, que possibilita redução do potencial citotóxico e carcinogênico dos mesmos. Assim, o objetivo deste trabalho foi isolar e caracterizar duas cepas bacterianas isoladas de solo contaminado com os corantes amaranço e vermelho congô e avaliar o seu potencial de biodegradação perante estes corantes. Dez microrganismos capazes de degradar ambos os corantes foram isolados, e as condições ideais de biodegradação foram avaliadas (temperaturas de 30, 35 e 40° C, e pHs 7,0; 7,5 e 8,0). Os isolados mais promissores 1B12 (*Citrobacter portucalensis*) e 1A32 (*Citrobacter portucalensis*) foram selecionados, e as condições ideais para máxima eficiência do processo foram: 35° C e pH 7,5. Para cada corante foi avaliado o potencial de biodegradação dos tratamentos: 1B12 e 1A32 (isolados) e 1B12 + 1A32 (em conjunto). A cinética de degradação foi avaliada por leituras no UV/visível a cada 12 horas (520 nm para o amaranço e 490 nm para o vermelho congô). Os três tratamentos degradaram mais de 90% do corante amaranço após 48 horas, e mais de 90% do corante vermelho congô após 144 horas, atingindo a concentração máxima de células superior a  $10^9$  UFC.mL<sup>-1</sup>. Os metabólitos gerados após a biodegradação foram identificados no GC-MS. Os três tratamentos avaliados apresentaram como produto da biodegradação do amaranço três metabólitos em comum: fenol, indol e pirrolizidina; e na biodegradação do vermelho congô: indol, pirrolozidina e benzidina.

O estudo da toxicidade do produto da biodegradação em sementes de alface mostrou que ambos os corantes não reduziram a germinação das sementes. Entretanto, os produtos da degradação retardaram, ou até bloquearam, a germinação das mesmas. Assim, podemos concluir que a biodegradação dos corantes azo sintéticos por bactérias é uma alternativa biotecnológica viável. Porém, o estudo da toxicidade dos metabolitos gerados neste processo é um aspecto que não pode ser desconsiderado, uma vez que eles podem ser mais tóxicos que o próprio corante.

**Palavras-chave:** amaranto; vermelho congo; biodegradação; bactérias.

## ABSTRACT

Azo dyes are a class of synthetic dyes with a wide variety of colors and shades, which have a vast application in the industry. Amaranth is an azo dye used to color foods and Congo red is used to color textile fibers. Both are difficult to degrade by physical-chemical methods, and biodegradation by microorganism is an easy to apply technique and environmentally safe alternative that can reduce their cytotoxic and carcinogenic potential. Thus, this work aimed to isolate and characterize two bacterial strains from soils contaminated with azo dyes amaranth and red congo, and to evaluate their biodegradation potential. Ten bacterial isolates able to degrade both dyes were isolated and ideal conditions of biodegradation were evaluated (temperatures of 30, 35 and 40 ° C, and pHs 7.0, 7.5 and 8.0). The most promising isolates 1B12 (*Citrobacter portucalensis*) and 1A32 (*Citrobacter portucalensis*) were selected, and the ideal conditions for maximum biodegradation efficiency were: 35 ° C and pH 7.5. For each dye, three treatments were evaluated: 1B12 and 1A32 (isolated) and 1B12 + 1A32 (together). Degradation kinetics were evaluated by UV/visible readings every 12 hours (520 nm for amaranth and 490 nm for red congo). The three treatments degraded more than 90% of the amaranth after 48 hours, and more than 90% of the Congo red after 144 hours, reaching cells concentration of up to 10<sup>9</sup> cfu.mL<sup>-1</sup>. The metabolites generated after biodegradation were identified in GC-MS. The three treatments presented as a biodegradation product of the amaranth three common metabolites: phenol, indole and pyrrolizidine; and biodegradation of Congo red: indole, pyrrolizidine and benzidine. The toxicity study of the biodegradation bioproducts in bean seeds showed that both dyes do not reduce germination potential, but the products of the biodegradation can be harmful to seed germination. Thus, we conclude



that biodegradation of synthetic azo dyes by bacteria is a viable biotechnological alternative, but the toxicity study of the metabolites generated in the process is an aspect that must be taken into account, since they may be more toxic than the dye itself.

**Keywords:** amaranth; congo red; biodegradation; bacteria.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Porcentagem de uso de diferentes tipos de corantes, no mundo, pelas indústrias de alimentos e bebidas .....	21
Figura 2 - Estrutura química do corante amarantho .....	23
Figura 3 - Estrutura química do corante vermelho congo.....	26
Figura 4 - Cinética de degradação do corante amarantho e número de unidades formadoras de colônia (UFC) dos três tratamentos avaliados em um período de incubação de 48 horas a 35° C, pH 7,5. (A) isolado 1B12, (B) isolado 1A32, e (C) 1B12 + 1A32 .....	38
Figura 5 - Estrutura química do corante amarantho e dos três principais metabólitos gerados na biodegradação: Pirrolizidina, fenol e indol.....	40
Figura 6 - Cinética de degradação do corante vermelho congo e número de unidades formadoras de colônia (ufc) dos três tratamentos avaliados em um período de 144 horas a 35° C, pH 7,5. (A) isolado 1B12, (B) isolado 1A32 e (C) 1B12 + 1A32 .....	44
Figura 7 - Estrutura química do corante vermelho congo e dos três principais produtos de degradação do corante: Pirrolizidina, benzidina e indol .....	46

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Corantes artificiais azo utilizados no Brasil e as permissões de utilização conforme agências internacionais e países de referência no mundo.....	22
Tabela 2 - Identificação dos isolados bacterianos deste trabalho .....	35
Tabela 3 - Porcentagem e tempo de degradação do corante amaranth pelos isolados bacterianos após 96 horas de incubação a 30° C nos pHs 7,0; 7,5 e 8,0 .....	36
Tabela 4 - Porcentagem e tempo de degradação do corante amaranth pelos isolados bacterianos após 96 horas de incubação a 35° C nos pHs 7,0; 7,5 e 8,0 .....	37
Tabela 5 - Principais compostos identificados como produto da degradação do corante amaranth após 96 horas de incubação a 35° C em pH 7,5 pelos três tratamentos avaliados .....	39
Tabela 6 - Número de sementes de alface germinadas após 3, 7 e 12 dias de incubação nos cinco tratamentos avaliados.....	41
Tabela 7 - Porcentagem e tempo de degradação do corante vermelho congo pelos isolados bacterianos selecionados após 96 horas de incubação a 30° C nos pHs 7,0; 7,5 e 8,0 .....	42
Tabela 8 - Porcentagem e tempo de degradação do corante vermelho congo pelos isolados bacterianos selecionados após 96 horas de incubação a 35° C nos pHs 7,0; 7,5 e 8,0 .....	43
Tabela 9 - Principais compostos identificados como produto da degradação do corante vermelho congo após 144 horas de incubação a 35° C em pH 7,5 pelos três tratamentos avaliados .....	45
Tabela 10 - Número de sementes de alface germinadas após 3, 7 e 12 dias de incubação nos cinco tratamentos avaliados.....	46

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>14</b>
<b>2 HIPÓTESE .....</b>	<b>16</b>
<b>3 OBJETIVOS.....</b>	<b>17</b>
3.1 Objetivo geral .....	17
3.2 Objetivos específicos .....	17
<b>4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>18</b>
4.1 Histórico dos corantes e pigmentos .....	18
4.2 Classificação .....	19
4.3 Corantes alimentares .....	20
4.4 Corantes azo alimentares.....	21
4.5 Corante azo amarantho .....	23
4.6 Corantes têxteis .....	24
4.7 Corantes azo têxteis.....	25
4.8 Corante azo vermelho congo .....	25
4.9 Biodegradação de corantes.....	27
<b>5 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>30</b>
5.1 Isolamento dos microrganismos.....	30

5.2 Identificação dos microrganismos obtidos.....	31
5.3 Estudo das condições ideais para degradação dos corantes.....	31
5.4 Estudo da cinética de degradação dos corantes.....	32
5.5 Análise dos metabólitos formados após a descoloração.....	33
5.6 Estudo de toxicidade dos metabólitos gerados .....	33
<b>6 RESULTADOS.....</b>	<b>35</b>
6.1 Biodegradação do corante amaranto (AM).....	36
6.1.1 Determinação das condições ideais de biodegradação .....	36
6.1.2 Cinética de degradação do amaranto.....	37
6.1.3 Identificação dos metabólitos gerados após a biodegradação do amaranto .....	38
6.1.4 Estudo da toxicidade dos produtos da biodegradação do amaranto.....	40
6.2 Biodegradação do corante vermelho congo (VC).....	41
6.2.1 Determinação das condições ideais de biodegradação .....	41
6.2.2 Cinética de degradação do vermelho congo .....	43
6.2.3 Identificação dos metabólitos gerados após a biodegradação do corante vermelho congo.....	45
6.2.4 Estudo da toxicidade dos produtos da biodegradação do vermelho congo	46
<b>7 DISCUSSÃO .....</b>	<b>48</b>
7.1 Corante Amaranto .....	48
7.1.1 Estudo das condições ideais e cinética de degradação do corante amaranto .....	48
7.1.2 Estudo dos metabólitos gerados após a degradação do corante amaranto .....	49
7.1.3 Estudos da toxicidade dos produtos da biodegradação do corante amaranto .....	51
7.2 Corante Vermelho congo.....	52
7.2.1 Estudo das condições ideais e cinética de degradação do corante vermelho congo .....	52
7.2.2 Estudo dos metabólitos gerados após a degradação do corante vermelho congo .....	54

7.2.3 Estudos da toxicidade dos produtos da biodegradação do corante vermelho congo .....	55
<b>8 CONCLUSÃO .....</b>	<b>57</b>
<b>9 PERSPECTIVAS.....</b>	<b>58</b>
<b>10 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>59</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Corantes podem ser substâncias naturais ou compostos sintéticos, e no sentido amplo do termo, corante designa toda e qualquer substância que dá cor, colore, tingem ou pinta (DELLAMATRICE; MONTEIRO, 2004). A partir do século XIX, o crescimento contínuo da população e o incremento na demanda industrial tiveram significativo papel no desenvolvimento e no uso de corantes sintéticos (KHAN et al., 2013). Estes corantes são amplamente utilizados em muitos tipos de indústrias, tais como têxtil, couro, alimentos, cosméticos e farmacêutica (KHAN et al., 2013). Seu descarte tem recebido muita atenção nas últimas décadas, pois seu resíduo é tóxico e pode causar a poluição do solo e da água que estão diretamente relacionados com a saúde humana e a produção de alimentos (MOHAMMADI et al., 2014).

As classificações dos corantes tornaram-se obrigatórias devido ao enorme aumento do tipo e número de corantes. Por esta razão, os corantes são classificados de acordo com sua estrutura, fonte, cor, solubilidade e métodos de aplicação. No entanto, devido às complexidades da nomenclatura de cores com base na estrutura química, a classificação baseada na aplicação é frequentemente considerada mais vantajosa (YAGUB et al., 2014; GÜRSES et al., 2016).

O mercado global de pigmentos e corantes previu atingir 9,9 milhões de toneladas e US\$ 26,53 bilhões para o ano de 2017, impulsionado pelo crescimento das principais indústrias de uso final (GÜRSES et al., 2016). Os corantes azo são os corantes mais utilizados e representam mais de 60% dos corantes totais (GUPTA; SUHAS 2009; SHAH, 2014; GÜRSES et al., 2016). Estes corantes contêm pelo menos uma ligação dupla de nitrogênio-nitrogênio ( $-N=N-$ ), no entanto, muitas estruturas diferentes são possíveis (GROWTHER e MEENAKSHI, 2008; GÜRSES et al., 2016).

Esta mistura estrutural complexa na estrutura química dos corantes azo constitui uma séria preocupação ambiental, pois a clivagem redutora da ligação azo é responsável pela formação de aminas, que são classificadas como tóxicas e cancerígenas (RAVAL, 2016).

A biodegradação de corantes por métodos biológicos é considerada eficaz e ambientalmente segura. Este tipo de tratamento resulta na bioconversão parcial ou completa dos poluentes orgânicos, gerando um produto final estável e não tóxico (RAVAL, 2016). Em muitos estudos de biodegradação são utilizados microrganismos que possuem a capacidade de metabolizar o corante, reduzindo-o a formas menos tóxicas (RAVAL, 2016). A aplicação de bactérias para biodegradação de corantes é uma ferramenta biotecnológica interessante para o desenvolvimento de processos de biorremediação e para o tratamento de efluentes e águas residuais. As bactérias mais promissoras para tratamentos de águas residuais contaminadas com corantes podem ser extraídas do solo ou de ambientes que já contenham corantes sintéticos aderidos ao material orgânico, como por exemplo, o lodo proveniente de estações de tratamento ou de locais onde são despejados estes resíduos (RAVAL, 2016).

Sabendo dos problemas causados pela contaminação ambiental por corantes, tanto à saúde humana quanto ao meio ambiente, o uso de microrganismos para o tratamento destes corantes é uma ferramenta biotecnológica vista como ambientalmente correta. Este estudo objetiva isolar microrganismos que sejam eficientes na biodegradação de corantes alimentícios e têxteis, reduzindo a sua toxicidade e os danos ambientais causados por estes.



## **2 HIPÓTESE**

Existem bactérias no solo que são capazes de degradar os corantes vermelho congo e amaranto em ambiente microaerófilo e, os metabólitos resultantes desta degradação não são tóxicos para a germinação de sementes de alface.

## 3 OBJETIVOS

### 3.1 Objetivo geral

Este estudo tem por objetivo isolar e caracterizar cepas bacterianas a partir de amostras de solo contaminado, que sejam eficazes na biodegradação do corante alimentício amaranço e do corante têxtil vermelho congo, além de verificar se os metabólitos originários da biodegradação são tóxicos para a germinação de sementes de alface.

### 3.2 Objetivos específicos

- Isolar bactérias de solo contaminado com os corantes amaranço e vermelho congo;
- Avaliar as condições ideais de temperatura e pH para a biodegradação;
- Identificar os microrganismos obtidos pelo sequenciamento do gene *16S rRNA*,
- Selecionar dois isolados e avaliar a cinética da degradação dos corantes;
- Identificar os metabólitos obtidos após a descoloração da solução por Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas (GC-MS);
- Verificar se os metabólitos obtidos após a descoloração são tóxicos para o desenvolvimento de plantas de alface.

## 4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Nesta revisão bibliográfica serão abordados os principais aspectos relacionados a corantes artificiais, especialmente o amaranth e seu uso em alimentos, e o vermelho congo e seu uso em fibras têxteis. Também serão abordados aspectos relevantes de toxicidade a saúde humana e plantas, bem como os principais métodos usados para tratamento e/ou biodegradação destes.

### 4.1 Histórico dos corantes e pigmentos

Os corantes são caracterizados por sua habilidade de absorver e emitir cor na faixa da luz visível. O homem tem usado corantes naturais desde a pré-história, sendo que sua presença já foi relatada em cavernas na Europa, Egito e na China. O primeiro corante orgânico foi sintetizado por William Perkin em 1856, e foi denominado *Mauve*. Esta descoberta foi o começo do desenvolvimento de uma moderna indústria de corantes sintéticos (ZOLLINGER 2003). Já no fim do século XIX, fabricantes de corantes sintéticos estabeleceram-se na Europa, suprimindo as necessidades das indústrias da época que fabricavam tecidos, couro e papel (DELLAMATRICE; MONTEIRO 2004). Assim, os corantes vêm se tornando uma ameaça para a saúde pública e ambientes naturais, pois principalmente os corantes azo sintéticos e seus metabólitos são tóxicos, cancerígenos e mutagênicos (SARATALE et al. 2013).

## 4.2 Classificação

Um dos principais sistemas de classificação de corantes usado internacionalmente é o *Colour Index* (O'NEIL et al. 1999). Neste sistema, são duas as principais formas de classificação dos corantes: de acordo com a sua estrutura química ou de acordo com o método de aplicação (CHRISTIE 2014). Esta segunda forma é o principal método, adotado pelo *Colour Index* (C.I.) (PEPLING et al. 1997). Os corantes utilizados em alimentos, por exemplo, são usualmente classificados segundo sua origem. Por outro lado, os corantes para uso em têxteis são classificados pelo grupo cromóforo ou pela afinidade às fibras (DOWNHAM; COLLINS 2000; GOMES 2001).

Para ser um corante, um composto deve conter tanto um grupo cromóforo quanto um auxocromo. Os mais importantes cromóforos azo são (-N=N-), carbonila (-C=O), metino (-CH=), nitro (-NO<sub>2</sub>), e grupo quinoide. Os mais importantes auxocromos são amina (-NH<sub>2</sub>), carboxila (-COOH), sulfonato (-SO<sub>3</sub>R) e hidroxila (-OH) (WELHA, 2000; KHAN; MALIK 2014). Tendo como referência a estrutura química do grupo cromóforo, corantes são classificados como azo, antraquinona, trifenilmetano, corantes heterocíclicos e poliméricos, e corantes ftalocianinas (YANG et al. 2009; KHAN R. 2013; KHAN; MALIK 2014). São constituídos de átomos responsáveis pela cor da tintura chamados cromóforos, bem como um elétron de retirada ou um elétron doador substituinte, que causa ou intensifica a cor dos cromóforos, chamado auxocromo (CHRISTIE 2014; KHAN; MALIK 2014).

Segundo Saron e Felisberti (2006), a diferença básica entre pigmentos e corantes está no tamanho da partícula e na solubilidade no meio em que é inserido. Estes autores afirmam ainda que a solubilidade de um determinado corante pode ser determinada pela presença de certos grupos químicos na estrutura do composto, os quais podem ocasionar as diferenciações entre pigmentos e corantes.

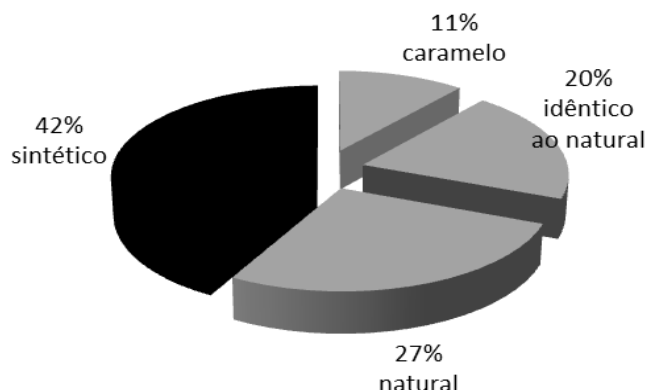
### 4.3 Corantes alimentares

Adicionar cores aos alimentos e bebidas pode tornar estes produtos mais atraentes para os consumidores. Diversas pesquisas identificaram que a cor produz efeitos no humor dos indivíduos e na percepção de qualidade dos produtos. Provavelmente por isso, instintivamente ou conscientemente, as cores são amplamente utilizadas na fabricação de alimentos (DOWNHAM; COLLINS 2000; ASHFAQ; MASUD 2002).

Segundo a Resolução nº 44, de 25 de novembro de 1977, da Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos (CNNPA), do Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), é considerado como corante alimentício a substância ou a mistura de substâncias que possuem a propriedade de conferir ou intensificar a coloração de um alimento (ou bebida). No Brasil, a primeira lei sobre o uso de corantes foi criada em 1977 (resoluções CNNPA nº 11, 37 e 44), depois atualizada nos anos de 1997 e 1999 (Portarias nº 540 e 1003), tentando acompanhar a legislação dos EUA, da Europa e do MERCOSUL (BRASIL, 2016).

O uso de corantes para fins alimentícios exige avaliações de sua toxicidade, solubilidade (em água e/ou solventes alcoólicos), reatividade química com outros componentes do alimento, estabilidade quanto à luz, calor e umidade, entre outros (PRADO, 2009). Ao longo do século 20, os corantes foram considerados substâncias que conferem maiores riscos à saúde do que qualquer outra categoria de aditivos alimentares (KOBYLEWSKI; JACOBSON 2012). As publicações sobre o tamanho exato do mercado de corantes alimentícios em escala global, no início dos anos 2000, mostravam que uma estimativa razoável do gasto com corantes na indústria seria de US\$ 940 milhões por ano, que pode ser segmentado conforme Figura 1 (DOWNHAM; COLLINS 2000).

Figura 1 - Porcentagem de uso de diferentes tipos de corantes, no mundo, pelas indústrias de alimentos e bebidas



Fonte: DOWNHAM & COLLINS, 2000.

Os corantes utilizados em alimentos e bebidas são classificados de acordo com a sua origem: naturais (vegetal e animal) ou sintéticos (orgânicos artificiais e orgânicos idênticos aos naturais), como mostrado na Figura 1. Na produção industrial de alimentos prevalece o uso de corantes artificiais quando comparados aos corantes naturais (DOWNHAM; COLLINS 2000). Corantes alimentares sintéticos são divididos em cinco sub-classes: compostos Azo (como o Amaranto), Quinoflona (como o Amarelo quinolina), grupo Triarilmetanos (como o Azul brilhante), Indigoides (como o Índigo carmina), e Xantenos (como o Eritrosina) (MPOUNTOUKAS et al. 2010).

No Brasil, segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), é permitido o uso de onze corantes artificiais em alimentos, são eles: amarelo crepúsculo, amarelo tartrazina, azul brilhante, amaranto, azul indigota, azul patente V, vermelho ponceau 4R, vermelho 40, eritrosina, azorrubina e verde rápido FCF. As concentrações permitidas são estabelecidas de forma rigorosamente controlada, conforme o Ministério da Saúde (Decreto n. 55871/65, de 1965) (BRASIL 2016).

#### 4.4 Corantes azo alimentares

Os corantes azo apresentam em sua estrutura um anel naftaleno ligado a um segundo anel benzeno por uma ligação azo ( $-N=N-$ ). Esses anéis podem conter um, dois ou três grupos sulfônicos (GÜRSES et al. 2007). São uma importante classe de poluentes xenobióticos, e sua presença em ambientes aquáticos é de grande

preocupação devido aos seus riscos potenciais à saúde associados às suas propriedades tóxicas, alergênicas, mutagênicas, carcinogênicas e genotóxicas (AKAR et al. 2008; ZAHARIA et al. 2012; GUERRERO-CORONILLA et al. 2014). Os corantes pertencentes a essa classe são subdivididos em monoazo, diazo, alfa-naftol, beta-naftol, benzoimidazol, diazo de condensação, azo complexado com metais e isoindolinona/isoindolina (SARON; FELISBERTI 2006).

A toxicidade do corante é dependente de sua estrutura química, e pequenas alterações na molécula podem modificar os efeitos causados. Por isso, é importante avaliar correta e individualmente cada corante (UMBUZEIRO et al. 2005). A Tabela 1 mostra os corantes azo utilizados no Brasil, e a liberação ou proibição do uso na União Europeia, Estados Unidos, Canadá, Japão, e pelo Comitê Científico Internacional da (*Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives*-JECFA) (PRADO; GODOY 2009; MENDONÇA, 2011).

Tabela 1 - Corantes artificiais azo utilizados no Brasil e as permissões de utilização conforme agências internacionais e países de referência no mundo

<b>Corante</b>	<b>UE</b>	<b>EUA</b>	<b>Canadá</b>	<b>Japão</b>	<b>JECFA</b>
Ponceau 4R	-	B	-	P <sup>1</sup>	P
Amaranto	P	B	P	P <sup>1</sup>	P
Tartrazina	P	B	P	-	P
Azorubina	P	B	P <sup>2</sup>	P	P
Amarelo Crepúsculo	P	P	P <sup>2</sup>	P	P

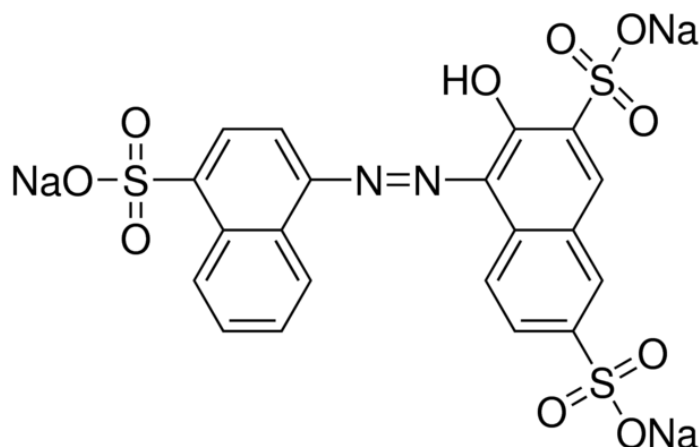
<sup>1</sup> Voluntariamente banido pelas indústrias de alimentos na região; <sup>2</sup> Em produtos específicos em uma concentração máxima de 300 ppm (partes por milhão); UE = União Europeia, EUA = Estados Unidos da América, JECFA = Comitê Científico Internacional; P = permitido; B = banido, - = não determinado. Fonte: PRADO; GODOY 2009; MENDONÇA 2011.

Dentre os corantes azo alimentares, o amarelo sunset (E-110), amaranto (E-123) e o amarelo tartrazina (E-102) tem maior enfoque para os toxicologistas e alergistas (GOMES et al. 2013). Poul et al. (2009) verificaram que os corantes, amarelo sunset, amaranto e amarelo tartrazina possuíam ação mutagênica em células de intestino de roedores ao serem tratados por via oral.

#### 4.5 Corante azo amarantho

O amarantho é um corante alimentício azo que apresenta boa estabilidade à luz, calor e ácido, mas descolore em presença de agentes redutores, como ácido ascórbico e  $\text{SO}_2$  (DOWNHAM; COLLINS 2000). Apresenta-se como um pó vermelho escuro ou marrom avermelhado, com quase nenhum odor, com gosto salgado, pH (solução 1% em água) de aproximadamente 10,8 (O'NEIL 2006; NCBI 2016). Sua estrutura química é apresentada na Figura 2, onde se observa a ligação dupla entre os nitrogênios, que é o grupo cromóforo da molécula.

Figura 2 - Estrutura química do corante amarantho



Fonte: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>.

Esta molécula apresenta o nome comercial corante amarantho (do inglês *amaranth*), mas possui como sinônimos os nomes de *bordeaux s*, corante vermelho nº 2, vermelho ácido nº 27 e azorubina S (NCBI 2016; PUBCHEM 2016). Seu nome químico é sal tri-sódico do ácido 3-hidroxi-4-(4-sulfo-1-naftyl azo)-naftaleno-1,3-di-sulfonato, com fórmula molecular  $\text{C}_{20}\text{H}_{11}\text{N}_2\text{Na}_3\text{O}_{10}\text{S}_3$  e massa molar  $604,47 \text{ g.mol}^{-1}$ . Seu número no *Colour Index* (C.I.) é 16185, seu ponto de fusão é maior que  $300^\circ \text{C}$ , e sua absorção máxima se dá a 520 nm. Sua síntese é obtida através de métodos sintéticos (NCBI 2016; PUBCHEM 2016).

Dentro da classe de corantes azo, o amarantho é classificado como monoazo, pois apresenta somente uma ligação  $\text{N}=\text{N}$  (PUBCHEM 2016; NCBI 2016). Apresenta o índice de ingestão diária aceitável como sendo de 0,5 mg por kg de peso do indivíduo, sendo



que valores superiores podem causar toxicidade aguda, carcinogenicidade, citotoxicidade e danos ao DNA (MPOUNTOUKAS et al. 2010; NCBI 2016). Este corante é solúvel em água, etanol, glicerol e propileno-glicol em diferentes concentrações, e insolúvel na maioria dos solventes orgânicos (O'NEIL 2006). É usado para colorir balas, goma de mascar, cereais, refrigerantes, cristais de fármacos, cápsulas, cosméticos e tinturas para cabelo (NCBI 2016; PUBCHEM 2016).

Em um estudo realizado por Sarikaya; Selvi e Erkoç (2012), o corante amaranço causou mutações somáticas na larva de *Drosophila melanogaster*. Mpountoukas et al. (2010) conduziram um experimento com cultura de células de sangue humano e demonstrou elevada citotoxicidade e genotoxicidade do corante amaranço em concentração de 4 mM a 8 mM. No entanto, estes corantes são os mais aplicados em alimentos, sendo permitido na União Europeia e no Canadá.

Segundo a resolução nº 387, de 05 de agosto de 1999, (BRASIL 2016); o corante amaranço é considerado no Brasil como aditivo alimentar e o regulamento técnico que aprova o uso de aditivos alimentares, estabelecendo suas funções e seus limites máximos para a categoria de alimentos 5: balas, confeitos, bombons, chocolates e similares, estabelece o uso de 0,010g/100g do corante alimentício amaranço como sendo o limite máximo (BRASIL 2016).

#### **4.6 Corantes têxteis**

Corantes têxteis representam uma categoria de compostos orgânicos sintéticos obtidos por meio de sínteses químicas, com a finalidade de conferir cor a uma fibra (ZAHARIA et al. 2009; SUTEU et al. 2009; KHAN; MALIK 2014). São constituídos de átomos responsáveis pela cor da tintura chamados cromóforos, bem como um elétron de retirada ou um elétron doador substituinte, que causa ou intensifica a cor dos cromóforos, chamado auxocromo (CHRISTIE 2014; KHAN; MALIK 2014). Considerando somente a sua estrutura geral, corantes têxteis são também classificados como aniônicos (direto, ácido e corantes reativos), não iônicos (corante disperso) e corantes catiônicos (azo básico, antraquinona disperso e corantes reativos) (ROBINSON et al. 2001; KHAN; MALIK 2014).

Em geral, as fibras têxteis podem agregar corantes nas suas estruturas, como resultado das forças Van der Waals, de ligações de hidrogênio e de interações hidrofóbicas. Logo, a absorção do corante nas fibras depende da natureza do corante e de seus constituintes químicos (CARMEM; DANIELA 2012; KHAN; MALIK 2014). Os três grupos mais comuns de corantes têxteis são azo, antraquinona e ftalocianina (AXELSSON et al. 2006; KHAN; MALIK 2014). Os corantes têxteis são corantes intermediários com alta aromaticidade e baixa biodegradabilidade que emergiram como grandes poluentes do meio ambiente (SARWAN et al. 2012), podendo ser visíveis na água a uma concentração tão baixa como  $1 \text{ mg L}^{-1}$  (SANDHYA 2010; KHAN R. 2012).

#### **4.7 Corantes azo têxteis**

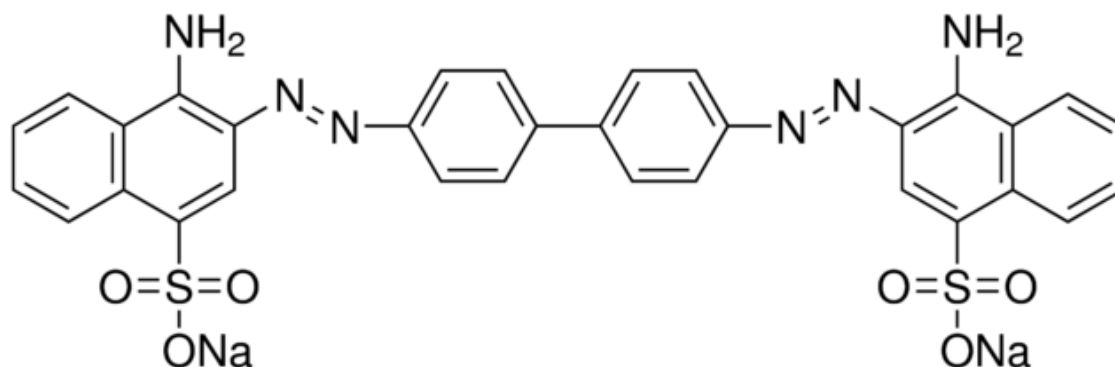
A produção mundial de corantes azo têxteis foi estimada em torno de 1 milhão de toneladas por ano no ano de 2006 (VIJAYKUMAR et al. 2007). Estes corantes são caracterizados por alta polaridade e alta recalcitrância (KHAN; MALIK 2014). São caracterizados também pela presença de uma ou mais ligações ( $\text{-N=N-}$ ) com anéis romáticos (ZOLLINGER 2003; KHAN R. 2012; KHAN; MALIK 2014). Estes corantes são sintetizados por meio da reação de uma amina primária ( $\text{R-NH}_2$ ), que é convertida a um sal diazônico que reage com outra unidade arila, ocorrendo uma substituição nucleofílica aromática (KHAN; MALIK 2014). Possuem anéis aromáticos ligados ao grupo azo, e alguns átomos podem ser substituídos por grupos sulfonados. Estes complexos substituintes aromáticos são responsáveis pela cor intensa, pela alta solubilidade em água, e pela resistência à degradação sob condições naturais (O'NEILL 2000; RAJAGURU 2000; KHAN; MALIK 2014).

#### **4.8 Corante azo vermelho congo**

Seu nome comercial é vermelho congo, mas apresenta sinônimos como vermelho de fenol ou vermelho direto 28 e vermelho direto R (NCBI 2016; PUBCHEM 2016). É um corante ácido, diazo, que é vermelho em solução alcalina e azul em

solução ácida (NCBI 2016; PUBCHEM 2016). É designado pelo nome químico sal sódico do ácido benzidinodiazobis-1-naftilamina-4-sulfônico (NCBI 2016; PUBCHEM 2016) com fórmula molecular  $C_{32}H_{22}N_6Na_2O_6S_2$  e peso molecular 696,66 g/mol (NCBI 2016; PUBCHEM 2016). Este corante é um pó vermelho acastanhado, inodoro, estável em condições normais, com pH variando de 3,0 a 5,0 (NCBI 2016; PUBCHEM 2016). Apresenta número de registro no *Colour Index* (C.I.) 22120 (NCBI 2016; PUBCHEM 2016). Seu ponto de fusão é maior que 360° C e sua absorção máxima é em 497 nm (NCBI 2016; PUBCHEM 2016). Na sua estrutura química (Figura 3) podem ser visualizadas as duas ligações (-N=N-) que o caracterizam como um diazo (NCBI 2016; PUBCHEM 2016).

Figura 3 - Estrutura química do corante vermelho congo



Fonte: National Center for Biotechnology Information (PubChem).

A clivagem de um ou mais grupos azoicos destes corantes pode formar aminas cancerígenas, tais como benzidina, e por isso eles todos caem na categoria de corantes azo proibidos (SPONZA; IŞIK 2005). O vermelho congo é um corante azo recalcitrante, o que é atribuído à presença de ligações do grupo aminobifenilo e azo, duas características geralmente consideradas xenobióticas (SPONZA; IŞIK 2005).

Um dos produtos da degradação do corante vermelho congo é a benzidina, que é tóxica para animais aquáticos e plantas, além de se acumular nos sedimentos das estações de tratamento de águas residuais (SPONZA; IŞIK 2005). Estudos recentes indicam que este corante também possui a capacidade de interferir no processo de dobramento e agregação das proteínas (FRID; ANISIMOV; POPOVIC 2007).

#### 4.9 Biodegradação de corantes

A biodegradação consiste na transformação de moléculas complexas em moléculas menores e mais simples. As moléculas complexas originais são muitas vezes indesejáveis ambientalmente e a biodegradação natural é muitas vezes catalisada por microrganismos presentes no solo ou em ecossistemas aquáticos (ASKU 2005). A biodegradação possui pelo menos três definições: a primeira, como uma pequena alteração em uma molécula orgânica, deixando a estrutura principal intacta; a segunda, como sendo a fragmentação de uma molécula orgânica complexa, de tal forma que os fragmentos possam ser reagrupados para se obter a estrutura original; e a terceira, como sendo a total mineralização da molécula orgânica (ASKU 2005). A eficácia das técnicas de descoloração para a remoção de corantes depende da sua classe, dos seus variados grupos substituintes, e as características físico-químicas do efluente, tais como pH, temperatura, conteúdo de sal e a presença de poluentes orgânicos (SOLIS et al. 2012).

A aplicação de microrganismos na biodegradação de corantes azo é uma alternativa promissora para o desenvolvimento de processos de tratamento de águas residuais contendo corantes (KHAN et al. 2012). As bactérias são os microrganismos mais frequentemente utilizados nestes processos pela facilidade de cultivo e rápido crescimento sob condições aeróbicas ou anaeróbicas (SOLIS et al. 2012). Corantes azo geralmente são resistentes ao ataque bacteriano sob condições aeróbicas, pois a presença de oxigênio usualmente inibe a atividade redutiva da ligação azo (SARATALE et al. 2011). A clivagem redutiva desta ligação é o passo inicial para a degradação, e a eficácia da descoloração microbiana depende da adaptabilidade e da atividade dos microrganismos selecionados (KHAN et al. 2012).

A descoloração microbiana pode ocorrer por biosorção, degradação enzimática ou a combinação de ambos (WU; LI; YANG 2012). A biosorção de corantes pode ocorrer nas células microbianas em crescimento, bem como sobre as células microbianas mortas (JANG et al., 2007). Os microrganismos biosorventes incluem principalmente bactérias, microalgas e fungos (TSAI; CHEN 2010). Neste caso, a estrutura original do corante permanece intacta, ou seja, não é degradado em fragmentos.

O processo anaeróbico de biodegradação converte o corante em compostos aminados tóxicos que, por tratamento posterior com reação aeróbica, converte os intermediários em CO<sub>2</sub>, biomassa e compostos químicos inorgânicos (KAHN et al. 2012). Neste caso, famílias de enzimas demonstram grande potencial de biodegradação, como as azoredutases, lacases e redutase (TELKE et al. 2010). Enzimas azoredutases provenientes de bactérias representam uma classe enzimática com pouca semelhança com outras redutases. Por exemplo, a expressão das azoredutases de *Bacillus subtilis* AzoR1 e AzoR2, que possuem em torno de 30% de similaridade de sequência de aminoácidos com a AzoR de *E. coli*, pode ser induzida por eletrófilos, tais como 2-metilhidroquinona (2-MHQ), catecol e diamida (KHAN et al., 2012). Porém, outras enzimas também são promissoras como a Manganês peroxidase (MnP), Lignina peroxidase (LiP), Polifenol oxidase (PPO) e as Tirosinases (TyR) (SINGH et al. 2015).

A descoloração de corantes ocorre por diferentes grupos tróficos de bactérias (PANDEY et al. 2007), dentre elas as espécies *Geobacillus stearothermophilus*, *Pseudomonas luteola*, *Micrococcus* spp., *Kocuria rosea*, *Sphingomonas paucimobilis* e *Bacillus badius* (SOLIS et al. 2012). Chang et al. (2001) mostraram a descoloração completa de vermelho congo por *Pseudomonas luteola*, em condições anaeróbicas, utilizando uma concentração média de corante de 200 mg L<sup>-1</sup>. Telke et al. (2010), em seu estudo com *Pseudomonas* sp. SU-EBT relataram a descoloração individual do vermelho congo e também descoloração composta dos corantes vermelho congo, preto eriocromo T, azul tripan azul remanzol 3R, vermelho reativo HE3B, usando uma concentração média de 100 mg L<sup>-1</sup> de corante, atingindo valores de descoloração acima de 90% em 60 horas, com redução de 50% e 45% de DQO e DBO, respectivamente.

Telke et al. (2010) descreveram o envolvimento de enzimas oxidoreduativas na descoloração de corantes azo. A atividade intracelular da lacase foi significativamente aumentada após 6 horas (incremento de 145%) e 12 horas (incremento de 160%) de incubação. Já a atividade extracelular da lacase foi significativamente diminuída após 12 horas (inibição de 50%). A atividade da azoredutase foi significativamente diminuída após 6 horas (inibição de 29%) e após 12 horas (inibição de 26%). As observações acima demonstram que o vermelho congo foi descolorido pelo envolvimento da lacase intracelular de *Pseudomonas* sp. SU-EBT (TELKE et al.

2010). Esta enzima demonstra maior eficiência para a descoloração de corantes têxteis (FARACO et al. 2009).

A seleção de microrganismos altamente eficientes na produção de enzimas degradadoras do substrato possui alto potencial biotecnológico (SINGH et al. 2015). Cepas bacterianas já mostraram habilidade de reduzir a ligação azo em ambiente aeróbico usando as azoredutases aeróbicas (LIN et al. 2008). Um interessante exemplo é o *Micrococcus sp.*, capaz de descolorir azo reativos sob condições anaeróbicas em 24 horas, e em 6 horas quando em ambientes aeróbicos (SOLIS et al. 2012).

Os metabólitos produzidos pela degradação de corantes, em muitos casos, são mais tóxicos que o próprio corante. Alguns metabólitos tóxicos já foram observados após a descoloração em ambiente microaerófilo, mas não em condições aeróbicas. Isto indica que, em sistemas aeróbicos, a ligação azo é primeiramente clivada por uma azoredutase, e então a amina aromática pode ser mineralizada em produtos menos tóxicos através de processos oxidativos (SOLIS et al. 2012).

A mudança na toxicidade é um aspecto normalmente negligenciado em estudos de descoloração de corantes. Mota et al. (2015) sugerem uma redução da toxicidade de vermelho congo quando usado um tratamento com lacase, utilizando o modelo de germinação de sementes de alface. Este estudo de toxicidade com o produto da degradação do vermelho congo mostrou a inibição do crescimento de sementes de alface na presença de quantidades crescentes de vermelho congo.

## 5 MATERIAL E MÉTODOS

### 5.1 Isolamento dos microrganismos

O isolamento dos microrganismos foi realizado a partir de amostras de solo coletadas no campus na Univates. Estas amostras foram contaminadas com os corantes amarantho (AM) e vermelho congo (VC) na concentração de 100 mg.Kg de solo<sup>-1</sup> e incubadas a 28° C durante 30 dias, diariamente a umidade do solo foi verificada e, semanalmente, estes solos recebiam uma dose dos corantes. As amostras foram processadas conforme descrito por Telke et al. (2010). Primeiramente, 15 gramas do solo contaminado (previamente descrito) foi enriquecido em 85 mL de caldo nutriente (peptona bacteriológica 10 g.L<sup>-1</sup>, extrato de levedura 3 g.L<sup>-1</sup> e cloreto de sódio 5 g.L<sup>-1</sup>) contendo 100 mg.L<sup>-1</sup> dos corantes AM e VC. A suspensão obtida foi incubada por 48 hrs à temperatura de 30° C sem agitação. Das culturas que apresentaram descoloração, 1 mL da suspensão foi transferido para um novo meio nutriente, contendo os corantes amarantho e vermelho congo (100 mg.L<sup>-1</sup>) separadamente e incubados a 30°C sem agitação até a completa descoloração. As suspensões que apresentaram descoloração foram selecionadas para o isolamento dos microrganismos. Para isto, uma alíquota do meio descolorido foi diluída em solução salina (0,85%) e inoculada em meio ágar nutriente com os corantes na concentração de 100 mg.L<sup>-1</sup>. As colônias obtidas foram testadas individualmente quanto sua capacidade de degradar os corantes em meio líquido. Foram feitas três combinações dos corantes: Meio nutriente + AM (100 mg.L<sup>-1</sup>); meio nutriente + VC (100 mg.L<sup>-1</sup>) e; meio nutriente + VC (100 mg.L<sup>-1</sup>) + AM (100 mg.L<sup>-1</sup>). Os 10 isolados que descoloriram os três tratamentos foram preservados em glicerol 50% a -20° C.

## 5.2 Identificação dos microrganismos obtidos

Os 10 isolados selecionados foram submetidos à extração de DNA genômico, de acordo com a metodologia descrita por Sambrook e Russel (2001), que utiliza Fenol e Clorofórmio para purificação. A qualidade e a quantidade do DNA obtido foram verificadas em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídeo. O DNA obtido foi utilizado como fita molde para amplificação do gene *16S rRNA* pela técnica de PCR. Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados para a amplificação de um fragmento de aproximadamente 1500 pb do *16S rRNA* foram pA (5'-AGAGTTTGATCTGGCTCAG-3') e 1492r (5'-TACGGTACCTTGTTACGACTT-3'). As condições do PCR que foram aplicadas incluíram uma desnaturação inicial por 2 min a 94° C, seguida por 35 ciclos de: 1 min a 94° C para desnaturação, 1 min a 55° C para anelamento dos oligonucleotídeos iniciadores, e 1.5 min a 72° C de extensão da fita de DNA; e finalmente, uma extensão final por 7 min a 72° C. Os fragmentos de DNA obtidos foram sequenciados, analisados e comparados às sequências oriundas do *GenBank* ([www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank)) e do servidor *EzTaxon-e* (disponível em: <http://eztaxon-e.ezbiocloud.net/>) para identificação dos isolados.

## 5.3 Estudo das condições ideais para degradação dos corantes

Para verificar as condições ideais do processo de descoloração, os microrganismos preservados foram inoculados separadamente em 15 mL de caldo nutriente divididos em dois tratamentos: AM (100 mg.L<sup>-1</sup>) e VC (100 mg.L<sup>-1</sup>) em ambiente microaerófilo (sem agitação) e em ambiente aerófilo (com agitação). A eficiência da descoloração foi avaliada visualmente a cada 12 horas nas temperaturas de 30° C, 35° C e 40° C, e pHs de 7; 7,5 e 8. Após a completa descoloração foi avaliada a porcentagem de degradação dos corantes em espectrofotômetro UV / visível (520 nm e 490 nm para AM e VC, respectivamente).



#### 5.4 Estudo da cinética de degradação dos corantes

Dois isolados que apresentaram melhor eficiência de descoloração foram selecionados e inoculados em 50 mL de meio caldo nutriente contendo os corantes em estudo a uma concentração de 200 mg.L<sup>-1</sup> e incubados por 24 horas a 35° C sem agitação. Os tratamentos avaliados foram: 1B12, 1A32 e 1B12 + 1A32, separadamente para os corantes AM e VC. Transcorridas as 24 horas de incubação, a suspensão bacteriana foi inoculada em 450 mL de caldo nutriente contendo a concentração de 200 mg. L<sup>-1</sup> do corante em pH 7,5. Alíquotas de 2 mL foram retiradas em intervalos regulares de 12 horas até a completa descoloração do meio. Estas alíquotas foram centrifugadas a 7000 rpm por 5 minutos para remoção das partículas em suspensão do meio e a descoloração do meio foi monitorada em espectrofotômetro com absorvância de 490 nm para o VC e 520 nm para o AM. A porcentagem de descoloração foi avaliada pela fórmula:

$$\% \text{ de descoloração} = \frac{(absorvância \text{ inicial}) \times (absorvância \text{ observada})}{(absorvância \text{ inicial})} \times 100$$

Onde:

Absorvância inicial = Leitura da absorvância da amostra com 100% do corante e sem o microrganismo;

Absorvância observada = Leitura da absorvância da amostra no período avaliado.

Em cada ponto no qual foi feita a leitura da absorvância foi avaliado o número de unidades formadoras de colônia (UFC).mL<sup>-1</sup>. Para isto, uma alíquota de 1 mL da solução foi submetida a diluições seriadas em solução salina (0,85%), e 0,1 mL das diluições 10<sup>-7</sup>, 10<sup>-8</sup> e 10<sup>-9</sup> foram inoculadas em ágar nutriente e incubadas por 24 horas a 35° C. Transcorrido este período, as colônias crescidas nas placas foram contadas com auxílio de uma lupa, e o número de UFC.mL<sup>-1</sup> foi determinado.

## 5.5 Análise dos metabólitos formados após a descoloração

Os bioprodutos formados após a descoloração dos corantes AM e VC pelos microrganismos selecionados (1B12, 1A32 e 1B12+1A32) foram analisados pela técnica de Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas (GC-MS). Primeiramente, para remoção das células bacterianas, o meio de cultura descolorido foi centrifugado a 10.000 rpm por 25 minutos (volume total de aproximadamente 500 mL). Os metabólitos gerados na descoloração foram extraídos com acetato de etila e concentrados em rota-evaporador à vácuo. Após, a amostra concentrada foi dissolvida em metanol e analisada no GC-MS. Todas estas análises foram feitas na central instrumental do CTTPA (Centro Tecnológico de Pesquisa e Produção de Alimentos) no Tecnovates. Os compostos foram identificados usando a biblioteca básica de espectro de massas NIST presente no *software* do computador.

## 5.6 Estudo de toxicidade dos metabólitos gerados

O estudo de fitotoxicidade foi conduzido para verificar a toxicidade do AM e do VC e dos metabólitos formados após a descoloração pelos microrganismos selecionados (1B12, 1A32 e 1B12+1A32) usando a temperatura de 35° C e pH 7,5. Os testes foram realizados com sementes de alface (*Lactuca sativa*). Primeiramente, as sementes de alface foram desinfestadas com uma lavagem em etanol 70% por 2 minutos, uma lavagem subsequente com hipoclorito 2% por 1 minuto, e 5 sucessivas lavagens com água destilada esterilizada. Em triplicatas, vinte sementes de alface foram acondicionadas em recipientes estéreis contendo duas folhas de papel de germinação umedecidas com um dos cinco tratamentos descritos a seguir:

- 1) meio de cultura (caldo nutriente - tratamento controle)
- 2) solução nutriente com corante AM (200 mg.L<sup>-1</sup>)
- 3) solução nutriente com corante VC (200 mg.L<sup>-1</sup>)
- 4) solução do corante AM descolorida pelos microrganismos 1B12 e 1A32 e também pelo consórcio bacteriano (1B12 + 1A32)
- 5) solução do corante VC descolorida pelos microrganismos 1B12 e 1A32 e também pelo consórcio bacteriano (1B12 + 1A32)

Os tratamentos foram acondicionados em estufa BOD na temperatura de 18° C e fotoperíodo de 15 hrs de luz e 9 hrs de escuro por 21 dias. Transcorrido este período, o número de sementes germinadas foi avaliado pela contagem de sementes que emitiram radícula.

## 6 RESULTADOS

Foram obtidos 10 isolados bacterianos com capacidade de degradar mais de 80% dos corantes AM e VC após 96 horas de incubação em um dos três pHs avaliados (7,0; 7,5 e 8,0). A lista da identificação dos gêneros dos isolados bacterianos está descrita na Tabela 2. Os gêneros bacterianos mais presentes entre os isolados foram *Bacillus* (três isolados) e *Burkholderia* (dois isolados), destacam-se também dois isolados do gênero *Citrobacter portucalensis*.

Tabela 2 - Identificação dos isolados bacterianos deste trabalho

Isolado	Genêro
VB4	<i>Bacillus</i> sp.
1A31	<i>Staphylococcus</i> sp.
1B12	<i>Citrobacter portucalensis</i>
1B61	<i>Burkholderia</i> sp.
1A32	<i>Citrobacter portucalensis</i>
VC1A1	<i>Bacillus</i> sp.
VC1A2	<i>Micrococcus</i> sp.
1B32	<i>Raoutella</i> sp.
1B11	<i>Burkholderia</i> sp.
1A21	<i>Pseudomonas</i> sp.

## 6.1 Biodegradação do corante amaranto (AM)

### 6.1.1 Determinação das condições ideais de biodegradação

Para verificar a eficiência do processo de descoloração do corante amaranto, as condições ideais de pH (7,0; 7,5 e 8,0) foram avaliadas nas temperaturas de 30° C; 35° C e 40° C, sem agitação (ambiente microaerófilo), e estão demonstradas nas Tabelas 3 e 4 respectivamente. O tempo mínimo para degradação do corante a 30° C foi 40 horas (Tabela 3). Um isolado bacteriano degradou menos de 90% deste corante em pH 7,0 (VB4), e nos pHs de 7,5 e 8,0 nenhum isolado bacteriano degradou menos que 94% do corante. A máxima eficiência de degradação foi 99,78%, obtida pelo isolado 1A31 incubado em pH 8,0.

Tabela 3 - Porcentagem e tempo de degradação do corante amaranto pelos isolados bacterianos após 96 horas de incubação a 30° C nos pHs 7,0; 7,5 e 8,0

Isolados		Período (horas)			% descoloração		
Bacterianos	pH	7,0	7,5	8,0	7,0	7,5	8,0
VB4		96	96	40	82,95	99,76	95,14
1A31		96	40	72	96,88	99,46	99,78
1B12		96	96	96	99,45	99,22	96,08
1B61		96	96	96	98,08	94,57	99,56
1A32		96	72	40	98,41	99,71	98,01
VC1A1		96	96	96	90,68	95,70	99,12
VC1A2		96	96	96	95,83	98,68	99,34
1B32		96	72	40	98,19	98,83	97,01
1B11		96	72	40	98,46	98,92	97,95
1A21		96	72	72	98,74	99,22	99,56

No segundo ensaio de degradação utilizou-se a temperatura de 35°C (Tabela 4). Nesta condição, dos 10 isolados bacterianos avaliados, oito conseguiram degradar o corante em 40 horas em pelo menos um dos pH avaliados. A máxima porcentagem de degradação do corante foi de 99,51%, obtida pelo isolado 1A21 após 72 horas de incubação a pH 7,5.

Tabela 4 - Porcentagem e tempo de degradação do corante amaranth pelos isolados bacterianos após 96 horas de incubação a 35° C nos pHs 7,0; 7,5 e 8,0

Isolados	pH	Período (horas)			% descoloração		
		7,0	7,5	8,0	7,0	7,5	8,0
<b>VB4</b>		96	96	96	98,96	98,92	92,32
<b>1A31</b>		40	40	40	95,94	96,92	98,12
<b>1B12</b>		-	72	72	-	98,58	89,50
<b>1B61</b>		96	96	40	99,45	99,22	97,40
<b>1A32</b>		40	40	72	96,66	97,60	98,12
<b>VC1A1</b>		40	40	72	98,96	99,07	98,29
<b>VC1A2</b>		40	72	96	96,55	99,41	99,12
<b>1B32</b>		40	40	40	97,09	97,31	98,40
<b>1B11</b>		-	40	40	-	96,92	98,84
<b>1A21</b>		40	72	96	98,41	99,51	90,05

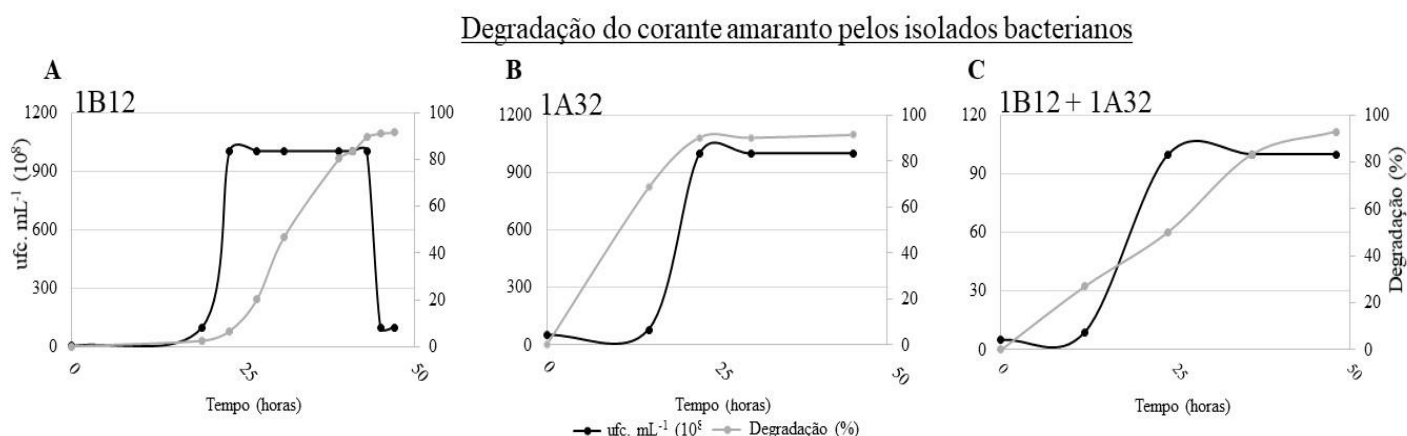
- : Condição não avaliada.

No ensaio com a temperatura de 40° C não houveram resultados evidentes de degradação do corante amaranth. Dessa forma, nesta condição não foram tabulados os resultados da degradação. Todo o experimento foi repetido com agitação de 130 rpm (ambiente aerófilo) e os microrganismos não apresentaram capacidade de degradar este corante.

### 6.1.2 Cinética de degradação do amaranth

Os isolados 1B12 e 1A32 foram selecionados pois apresentaram resultados eficientes na porcentagem e velocidade de descoloração do amaranth em todas as condições avaliadas, nos dois corantes avaliados. Para os experimentos de cinética de degradação, as condições selecionadas foram: pH 7,5 e temperatura de 35° C. Estes isolados bacterianos foram avaliados individualmente e em consórcio quanto a cinética de degradação e identificação dos metabólitos gerados. A Figura 4 mostra o número de unidades formadoras de colônias (UFC .mL<sup>-1</sup>) e a porcentagem de degradação do AM ao longo de um período de 48 horas, nos três tratamentos avaliados (1B12 [A], 1A32 [B] e 1B12 + 1A32 [C]).

Figura 4 - Cinética de degradação do corante amaranto e número de unidades formadoras de colônia (UFC) dos três tratamentos avaliados em um período de incubação de 48 horas a 35° C, pH 7,5. (A) isolado 1B12, (B) isolado 1A32, e (C) 1B12 + 1A32



O isolado 1B12 (Fig. 4A) degradou 91,5% do corante e atingiu o máximo  $10^{11}$  UFC. mL<sup>-1</sup> antes de entrar na fase de morte celular. Com este isolado bacteriano, a degradação iniciou juntamente com o período da fase estacionária de crescimento. O isolado 1A32 degradou 92,3% do corante AM e também atingiu a concentração máxima  $10^{11}$  UFC.mL<sup>-1</sup> (Fig. 4B). No período avaliado, não foi constatado o início do período de morte celular para este microrganismo. A velocidade de degradação do isolado 1A32 foi mais rápida, atingindo o valor máximo de degradação após 20 horas de incubação. A cinética de degradação do consórcio bacteriano (Fig. 4C) teve um padrão mais linear ao longo do período avaliado, com eficiência de degradação de 95%, atingindo uma concentração máxima de células de  $10^{10}$  UFC. mL<sup>-1</sup>

### 6.1.3 Identificação dos metabólitos gerados após a biodegradação do amaranto

Uma das etapas mais importantes do processo de biodegradação é o estudo dos metabólitos gerados após o processo. Assim, os mesmos isolados bacterianos avaliados quanto a cinética de degradação, foram avaliados para a caracterização dos metabólitos gerados. A Tabela 5 mostra os principais compostos identificados por GC-

MS como produto da biodegradação do corante AM (incubado a 35° C e pH 7,5), nos três tratamentos avaliados.

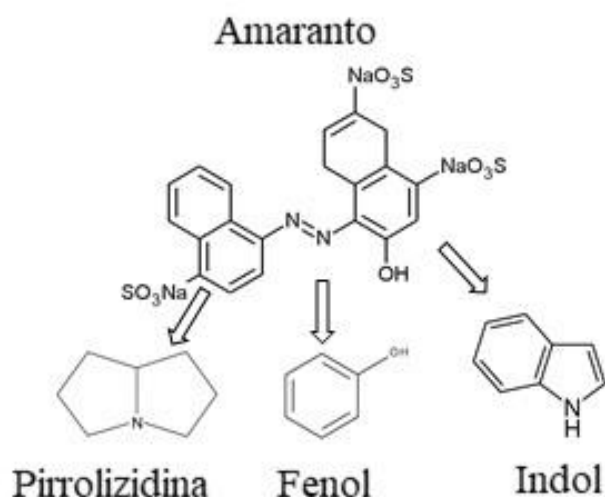
Tabela 5 - Principais compostos identificados como produto da degradação do corante amaranço após 96 horas de incubação a 35° C em pH 7,5 pelos três tratamentos avaliados

<b>Compostos</b>	<b>1B12</b>	<b>1A32</b>	<b>1B12 + 1A32</b>
<b>Fenol</b>	X	X	X
<b>Indol</b>	X	X	X
<b>Pirrolizidina</b>	X	X	X
<b>Ácido ascórbico</b>	X		
<b>Ácido octanoleico</b>	X		
<b>Ácido Octadenoico</b>	X		
<b>Piperazinediona</b>		X	X
<b>Ergotaman</b>		X	
<b>Eicosano</b>		X	
<b>Glicil-glicina</b>			X
<b>Ciclo-propil-carbonil</b>		X	
<b>Dihidroacetil- Furano</b>			X
<b>Óxido, tri-fenil-fosfino</b>			X

Os três tratamentos avaliados apresentaram como produto da biodegradação três metabólitos em comum: Fenol, Indol e Pirrolizidina (Tab. 5). Três compostos foram únicos em cada um dos tratamentos: no 1B12 foram ácido ascórbico, ácido octanoleico e ácido octadenoico; no 1A32 foram ergotaman, eicosano e ciclo-propil-carbonil; e no consórcio (1A32 + 1B12) foram dihidroacetil- durano, óxido, tri-fenil-fosfino e glicil-glicina (Tabela 5).



Figura 5 - Estrutura química do corante amaranço e dos três principais metabólitos gerados na biodegradação: Pirrolizidina, Fenol e Indol



Fonte: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>.

#### 6.1.4 Estudo da toxicidade dos produtos da biodegradação do amaranço

Nesta etapa foi feito um estudo da influência dos produtos da biodegradação na germinação de sementes de alface. Neste contexto, foram avaliados cinco tratamentos: controle (somente o meio de cultura - C), meio de cultura com corante AM, e meio de cultura com o corante amaranço degradado pelos microrganismos (1B12, 1A32 ou 1B12 + 1A32). A adição do corante ao meio de cultura reduziu levemente o número de sementes germinadas, mas os produtos da biodegradação do corante pelos microrganismos foram mais tóxicos que o próprio corante (Tabela 6). Até o décimo dia de incubação, nenhuma semente germinou nos tratamentos com o corante biodegradado. Os tratamentos 1B12 e 1A32 apresentaram poucas sementes germinadas após o décimo dia, enquanto que o consórcio de microrganismos (1B12 + 1A32) não apresentou germinação até o 19º dia.

Tabela 6 - Número de sementes de alface germinadas após 3, 7 e 12 dias de incubação nos cinco tratamentos avaliados

	Número de sementes germinadas		
	3 dias	7 dias	12 dias
<b>C</b>	12,3 ± 6,1	12,3 ± 6,1	12,6 ± 6,6
<b>AM</b>	8,0 ± 6,4	9,6 ± 5,9	9,6 ± 5,9
<b>1B12</b>	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	1,7 ± 1,6
<b>1A32</b>	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	2,6 ± 3,0
<b>1B12 + 1A32</b>	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0

C = Controle somente com meio de cultura, AM = meio de cultura + corante Amarantho (200 mg.L<sup>-1</sup>)

## 6.2 Biodegradação do corante vermelho congo (VC)

### 6.2.1 Determinação das condições ideais de biodegradação

Os mesmos 10 microrganismos avaliados na biodegradação do corante AM foram avaliados na biodegradação do corante VC. Foi testada a eficiência de descoloração pela inoculação dos microrganismos após 96 horas de incubação. As condições avaliadas foram: temperaturas de 30° C, 35° C e 40° C e pHs de 7,0; 7,5 e 8,0. Devido a sua estrutura química mais complexa, o corante vermelho congo demorou mais tempo para ser biodegradado. O tempo mínimo observado para degradação deste corante a 30° C foi de 40 horas em pH 8,0 somente pelo isolado bacteriano 1B12. Quatro isolados bacterianos (1B61, 1A32, 1B32 e 1A21) descoloriram o meio em 72 horas em pH 7,5, e um isolado (1B32) em pH 8,0. Em pH 7,0, todos os isolados bacterianos precisaram de 96 horas para máxima eficiência de degradação. A porcentagem de descoloração mínima obtida foi de 22,6% em pH 7,0, pelo isolado VB4, e a porcentagem máxima foi de 95,94% em pH 7,5, pelo isolado 1B32 (Tabela 7).

Tabela 7 - Porcentagem e tempo de degradação do corante vermelho congo pelos isolados bacterianos selecionados após 96 horas de incubação a 30° C nos pHs 7,0; 7,5 e 8,0

Isolados		Período (horas)			% descoloração		
Bacterianos	pH	7,0	7,5	8,0	7,0	7,5	8,0
<b>VB4</b>		96	96	96	22,60	84,06	81,90
<b>1A31</b>		96	96	96	72,03	75,00	76,72
<b>1B12</b>		96	96	40	74,01	65,00	83,33
<b>1B61</b>		96	72	96	76,55	83,44	50,29
<b>1A32</b>		96	72	96	82,77	92,50	81,61
<b>VC1A1</b>		96	96	96	59,60	83,75	80,17
<b>VC1A2</b>		96	96	96	29,66	58,13	63,51
<b>1B32</b>		96	72	40	86,72	95,94	77,59
<b>1B11</b>		96	96	72	77,12	63,75	66,09
<b>1A21</b>		96	72	96	56,78	85,63	75,00

A Tabela 8 mostra a eficiência da degradação do corante vermelho congo em três pHs (7,0; 7,5 e 8,0) incubados a 35° C. Em pH 8,0, dois isolados (1B12 e 1B32) tiveram máxima eficiência de degradação em 40 horas, e um isolado (1B11) apresentou máxima eficiência de degradação em 72 horas. Em pH 7,5; quatro isolados (1B61, 1A32, 1B32 e 1A21) tiveram máxima eficiência de degradação em 72 horas. Nesta temperatura, a porcentagem mínima de descoloração do VC foi de 50,63% (pH 7,5), pelo isolado 1A31, e a máxima eficiência (96,88%) foi do isolado VC1A1 (pH 7,5).

Tabela 8 - Porcentagem e tempo de degradação do corante vermelho congo pelos isolados bacterianos selecionados após 96 horas de incubação a 35° C nos pHs 7,0; 7,5 e 8,0

Isolados	pH	Período (horas)			% descoloração		
		7,0	7,5	8,0	7,0	7,5	8,0
<b>VB4</b>		96	96	96	88,70	74,69	60,06
<b>1A31</b>		96	96	96	86,72	50,63	66,95
<b>1B12</b>		96	96	40	94,07	84,06	83,33
<b>1B61</b>		96	72	96	84,18	55,94	91,67
<b>1A32</b>		96	72	96	89,55	74,38	74,14
<b>VC1A1</b>		96	96	96	83,62	96,88	60,06
<b>VC1A2</b>		96	96	96	95,20	53,13	51,44
<b>1B32</b>		96	72	40	93,22	68,44	82,18
<b>1B11</b>		96	96	72	-	84,69	80,17
<b>1A21</b>		96	72	96	78,25	55,00	28,45

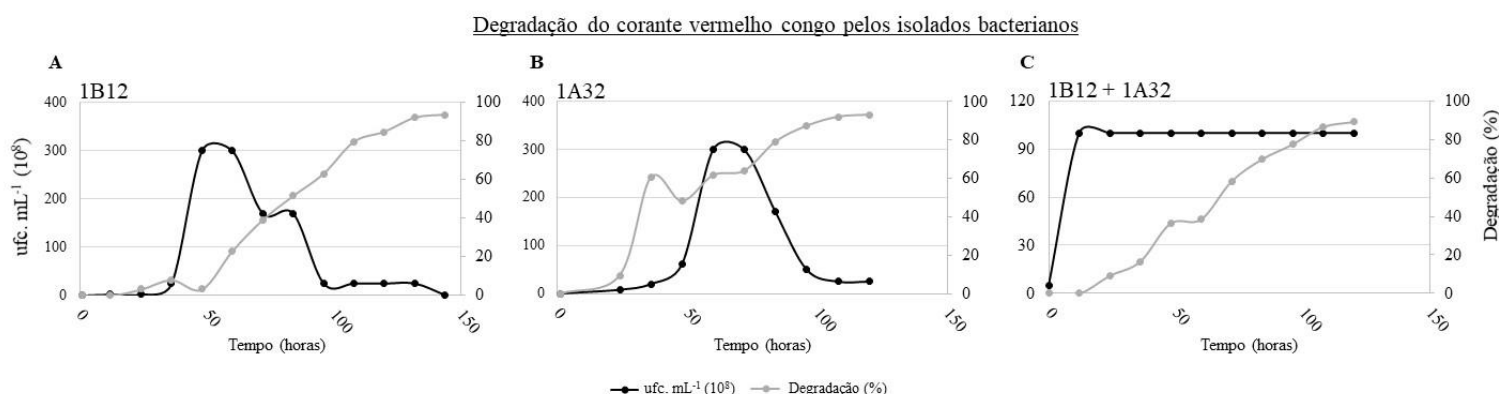
Nas condições de ensaio com a temperatura de 40° C, não houveram resultados evidentes de degradação do corante vermelho congo. Dessa forma, nesta condição não foram tabulados os resultados de período de degradação, leituras de absorbância e percentual de degradação. Este experimento também foi repetido com agitação (ambiente aerófilo), e os microrganismos não apresentaram capacidade de degradar este corante.

### 6.2.2 Cinética de degradação do vermelho congo

Para o estudo de cinética de descoloração do corante vermelho congo foram selecionados os mesmos isolados 1B12 e 1A32, que apresentaram resultado eficiente na porcentagem e velocidade de descoloração do VC em pH 7,5 e temperatura de 35° C. Mais uma vez, estes isolados bacterianos foram avaliados individualmente e em consórcio quando à cinética de degradação e identificação dos metabólitos gerados. A Figura 6 mostra o número de unidades formadoras de colônias (UFC. mL<sup>-1</sup>) e a

porcentagem de degradação ao longo de um período de 144 horas nos três tratamentos avaliados (1B12 [A], 1A32 [B] e 1B12 + 1A32 [C]).

Figura 6 - Cinética de degradação do corante Vermelho congo e número de unidades formadoras de colônia (UFC. mL<sup>-1</sup>) dos três tratamentos avaliados em um período de 144 horas a 35° C, pH 7,5. (A) isolado 1B12, (B) isolado 1A32 e (C) 1B12 + 1A32



A cinética de degradação do VC foi diferente da observada no AM. A degradação do VC ocorreu de forma aproximadamente linear nos três tratamentos avaliados (1B12, 1A32 e 1B12 + 1A32). O isolado 1B12 (Fig. 6A) degradou 94,3% do corante e atingiu o máximo 10<sup>10</sup> UFC. mL<sup>-1</sup> antes de entrar na fase de morte celular. O isolado 1A32 degradou 93,0% do corante vermelho congo e também atingiu a concentração máxima 10<sup>10</sup> UFC. mL<sup>-1</sup> (Fig. 6B). A cinética de degradação do consórcio bacteriano (Fig. 6C) apresentou um padrão mais linear com eficiência de degradação de 93,6%, e uma concentração máxima de células de 10<sup>9</sup> UFC. mL<sup>-1</sup>. Neste tratamento, não foi constatada o início do período de morte celular dos microrganismos.

### 6.2.3 Identificação dos metabólitos gerados após a biodegradação do corante vermelho congo

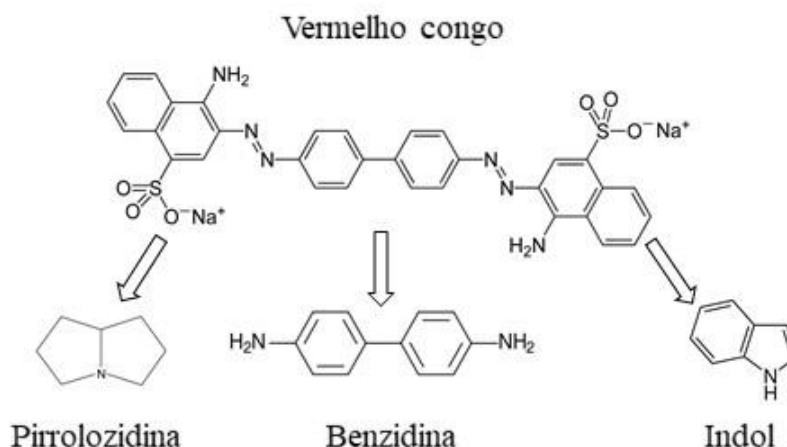
A identificação dos principais metabólitos gerados na biodegradação do corante VC está demonstrada na Tabela 9. Os compostos Indol, Pirrolizidina e Benzidina foram os principais compostos encontrados nos três tratamentos avaliados (Fig. 7).

Tabela 9 - Principais compostos identificados como produto da degradação do corante vermelho congo após 144 horas de incubação a 35°C em pH 7,5 pelos três tratamentos avaliados

<b>Compostos</b>	<b>1B12</b>	<b>1A32</b>	<b>1B12 + 1A32</b>
<b>Indol</b>	X	X	X
<b>Pirrolizidina</b>	X	X	X
<b>Benzidina</b>	X	X	X
<b>1-leucina, N-ciclopropil-carbonil</b>	X		X
<b>Dimetoxi-butano</b>		X	
<b>Fenol</b>		X	X
<b>Ácido butanoico</b>	X		
<b>N-propil acetato</b>			X
<b>Isobutil acetato</b>			X
<b>2,5-Piperazinediona 3,6-Bis (2-metil propil)</b>	X		X

Todos os compostos identificados na biodegradação do isolado 1B12 também foram identificados no consórcio bacteriano. Já no tratamento com o isolado 1A32, o composto dimetoxi-butano não foi encontrado no consórcio dos microrganismos. Os compostos N-propil acetato e isobutil acetato foram identificados somente no consórcio dos microrganismos.

Figura 7 - Estrutura química do corante vermelho congo e dos três principais produtos de degradação do corante: Pirrolizidina, Benzidina e Indol



Fonte: National Center for Biotechnology Information (PubChem).

#### 6.2.4 Estudo da toxicidade dos produtos da biodegradação do vermelho congo

Nesta etapa foi estudada a influência dos produtos da biodegradação do corante VC na germinação de sementes de alface (*Lactuca sativa*). Neste contexto, foram avaliados cinco tratamentos: controle (somente o meio de cultura - C), meio de cultura com corante vermelho congo (VC), e meio de cultura com o corante vermelho congo degradado pelos microrganismos (1B12, 1A32 ou 1B12 + 1A32 – Tabela 10).

Tabela 10 - Número de sementes de alface germinadas após 3, 7 e 12 dias de incubação nos cinco tratamentos avaliados

	Número de sementes germinadas		
	3 dias	7 dias	12 dias
<b>C</b>	12,3 ± 6,1	12,3 ± 6,1	12,6 ± 6,6
<b>VC</b>	7,0 ± 7,0	14,6 ± 3,0	14,6 ± 3,0
<b>1B12</b>	0,0 ± 0,0	11,0 ± 4,6	17,6 ± 6,5
<b>1A32</b>	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
<b>1B12 + 1A32</b>	0,0 ± 0,0	1,0 ± 1,0	8,6 ± 4,1

C = Controle somente com meio de cultura, VC = meio de cultura + corante vermelho congo (200 mg.L<sup>-1</sup>)

Este estudo mostrou que a adição do corante vermelho congo ao meio não teve efeito deletério na germinação das sementes, mas os produtos da biodegradação deste corante pelos microrganismos foram altamente tóxicos (Tabela 10). O produto da biodegradação obtido pelo isolado 1B12 retardou levemente a germinação nos primeiros dias, mas ao final do experimento pode ser considerada igual ao controle. O tratamento com o 1A32 não apresentou nenhuma semente germinada ao longo de 19 dias, enquanto que o consórcio de microrganismos (1B12 + 1A32) reduziu levemente a germinação das sementes.



## 7 DISCUSSÃO

### 7.1 Corante Amaranto

#### 7.1.1 Estudo das condições ideais e cinética de degradação do corante amaranto

No estudo das condições ideais procurou-se utilizar um isolado que nas condições ótimas de pH e temperatura pudesse apresentar um percentual elevado de descoloração do corante AM na concentração de 200 mg.L<sup>-1</sup>. A degradação do corante AM confirmou-se por meio de análise espectral UV-visível. Os isolados 1B12 e 1A32 apresentaram respectivamente os percentuais de 99,22% em um período de 96 horas e 99,71% em um período de 72 horas em pH 7,5 e temperatura de 35° C. No estudo de Anjaneya et al. (2013) foi demonstrada a biodegradação do corante azo sintético amaranto na concentração de 200 mg L<sup>-1</sup> por um isolado de *Bacillus* sp. relatando o valor 99% de degradação em um período de 24 horas de incubação com pH 7,2 e com temperatura de 37° C. No estudo de Shekhar, Jadhav et al. (2013) a descoloração máxima obtida foi de 97% em pH 7 e temperatura de 30° C em um período de 36 horas com um isolado de *Pseudomonas aeruginosa*.

A influência de pH, temperatura e concentração do corante AM é determinante no processo de degradação, pois otimiza o resultado e possibilita minimizar o erro para os ensaios com maior volume do corante em solução. Para os resultados de cinética de degradação dos isolados selecionados, ocorreram diferenças entre os

períodos de degradação do corante amaranth variando de 48 horas para o isolado (1B12) e de aproximadamente 20 horas para o isolado (1A32) e para o consórcio bacteriano. Outro dado relevante na cinética de degradação destes isolados, é fato de o isolado (1B12) ser o único isolado a apresentar período de morte celular, muito provavelmente sendo este isolado afetado pela formação de metabólitos tóxicos no meio após a degradação do corante amaranth. Halaburgi e Karegoudar (2016) demonstraram que a taxa de remoção de cor foi muito menor em condições ácidas e alcalinas de pH, mostrando que este parâmetro tem um efeito importante na eficiência da descoloração do corante. A tolerância ao pH de bactérias que atuam na descoloração é bastante importante, pois a cultura bacteriana geralmente exibe descoloração máxima em pH próximo ao neutro (SHAH, 2014). Tripathi, Srivastava (2012) mostraram que o pH ideal para descoloração do corante orange G por uma cepa de *Bacillus megaterium* ITBHU01 foi 6,9.

Características específicas que contribuem para a mutagenicidade de corantes azo estão relacionadas a diferenças em sítios de substituição, e o número e posição de grupos hidroxilo e sulfo ao lado da ligação azo. Por exemplo, corantes contendo um grupo hidroxilo na posição orto são mais tóxicos do que aqueles contendo um grupo hidroxilo na posição para. Do mesmo modo, as diferenças na biodegradabilidade estão associadas a características específicas. Em estudos que examinam esse fenômeno, descobriram que um grupo hidroxilo na posição 2 do anel naftol aumentou biodegradabilidade, enquanto que em outro estudo, relataram que os grupos sulfo em posições orto e para impediram a biodegradação (MAHMOOD et al 2016).

### **7.1.2 Estudo dos metabólitos gerados após a degradação do corante amaranth**

Nos estudos atuais de biodegradação, de uma forma geral, os pesquisadores buscam por um processo de mineralização do composto biodegradado. Para tanto, é importante observar os metabólitos formados na degradação dos produtos sintéticos. Na biodegradação por microrganismos, a produção dos mais diversos metabólitos está relacionada com o processo de degradação e o microrganismo utilizado no ensaio (SER et al. 2015). Por outro lado, é crescente o interesse de pesquisadores na identificação dos metabólitos após a biodegradação de produtos sintéticos, pois os

mesmos podem apresentar atividades biológicas e químicas que merecem estudos nas mais diversas áreas das ciências (SER et al. 2015). No processo de biodegradação do corante AM observado neste trabalho, buscou-se a mineralização deste corante, e que os produtos gerados na degradação não apresentassem atividade tóxica.

Corantes alimentares são uma importante fonte de poluentes, e sua presença em ambientes aquáticos é de grande preocupação devido aos seus riscos potenciais à saúde associados às suas propriedades tóxicas, alergênicas, mutagênicas, carcinogênicas e genotóxicas (AKAR et al. 2008; ZAHARIA et al. 2012; GUERRERO-CORONILLA et al. 2014). A toxicidade do corante é dependente de sua estrutura química, e de pequenas alterações na sua molécula que podem modificar os efeitos causados. Por isso, é importante avaliar correta e individualmente cada corante (UMBUZEIRO et al. 2005).

A detecção de composto orgânico heterocíclico no extrato é considerado uma das etapas mais importantes nos atuais estudos apresentados por Ser et al. (2015). As pirrolizidinas, também encontradas neste trabalho, são amplamente presentes ou sintetizadas em várias espécies de *Streptomyces* marinhas (SER et al. 2015). Além disso, estes compostos são conhecidos por apresentarem amplo espectro de bioatividades, que incluem: antitumoral, anti-angiogênese e antioxidante. Por exemplo, a detecção do composto conhecido como pirrolo [1,2-a] pirazina-1,4-dione, hexahidro (SER et al., 2015).

No extrato de *Streptomices* MUSC149T, Ser et al. (2015) sugeriram que a atividade antioxidante poderia ser estimulada por este composto. Neste trabalho, os autores demonstraram que a pirrolo [1,2-a] pirazina-1,4-diona, hexahidro foi capaz de eliminar ou reduzir a quantidade de radicais livres produzidos nas culturas celulares. Em suma, é provável que o este composto tenha um importante papel antioxidante na prevenção e tratamento de doenças crônicas (MORALES-GONZÁLEZ 2013). *Pseudomonas aeruginosa* BCH mostrou a capacidade de descolorir o corante xenobiótico azo amaranth na ausência de nutrientes orgânicos ou inorgânicos. Estas são descobertas significativas em relação ao estudo de biodegradação de corantes alimentícios, sendo que não há estudos sobre a biodegradação de tais compostos xenobióticos por uma espécie bacteriana (JADHAV et al. 2013).

O corante amarantho apresenta índice de ingestão diária aceitável de 0,5 mg por kg de peso do indivíduo, sendo que valores superiores podem causar toxicidade aguda, carcinogenicidade, citotoxicidade e danos ao DNA (MPOUNTOKAS et al., 2010; NCBI, 2016). Sarikaya; Selvi e Erkoç (2012) em seu estudo demonstraram que o corante amarantho causou mutações somáticas na larva de *Drosophila melanogaster*. Mpountoukas et al. (2010) conduziram um experimento com cultura de células de sangue humano e demonstraram elevada citotoxicidade e genotoxicidade do corante amarantho em concentração de 4 mM a 8 mM.

### **7.1.3 Estudos da toxicidade dos produtos da biodegradação do corante amarantho**

No ensaio de germinação de sementes de alface, os resultados evidenciaram o caráter tóxico dos metabólitos gerados pelos microrganismos ao degradar o corante AM. Ficou evidente nos tratamentos com os microrganismos 1B12 e 1A32 o atraso no processo de germinação das sementes, vindo a germinar somente a partir do 12º dia no caso do isolado 1A32, e nenhuma germinação para o isolado 1B12, comparando-os com os tratamentos controle (somente meio de cultura) e tratamento (AM), que tiveram germinação das sementes a partir do 3º dia.

Um estudo de fitotoxicidade do AM revelou que este corante foi tóxico para as sementes de *Sorghum vulgare* e *Triticum aestivum* (HADIBARATA et al. 2014). Muitos corantes azo e seus intermediários são tóxicos, mutagênicos e cancerígenos, e afetam organismos em sistemas aquáticos e terrestres. A toxicidade dos corantes azo variam dependendo de sua complexidade estrutural, grupos de substituição e reatividade (KHAN et al. 2012). Estudos de vários pesquisadores relataram a toxicidade de corantes sintéticos em ecossistemas contaminados (DAFALE et al. 2010; DE SÁ et al. 2009; OSUGI et al. 2009). De acordo com Oliveira et al. (2010) os corantes azo *Disperse Red 1* e *Disperse Red 13* também são mutagênicos para *Salmonella*, sugerindo que podem afetar a atividade e composição das comunidades microbianas que são sensíveis a estas toxinas (MAHMOOD et al. 2015).

Os metabólitos do corante de amarantho degradados por *Kerstersia sp.* mostraram resultados negativos nos testes de diazotização e carbilamina. Esses

resultados indicam que bactéria *Kerstersia sp.* isolada é responsável pela degradação do corante azo e o converteu em compostos aromáticos não tóxicos sem grupo amina, porque as aminas primárias são compostos tóxicos. Bactéria isolada *Kerstersia sp.* é de natureza termoalcalófila e o corante amarantho foi degradado em dois compostos aromáticos sem grupo amina (HALABURGI, KAREGOUDAR 2016).

## **7.2 Corante Vermelho congo**

### **7.2.1 Estudo das condições ideais e cinética de degradação do corante vermelho congo**

Devido a sua estrutura química mais complexa, a biodegradação do corante VC ocorreu em um período mais longo que a do corante AM. A estrutura do VC possui duas ligações nitrogênio/nitrogênio e também maior número de ligações com seus grupos auxocromos. As condições ideais determinadas foram pH 7,5 e temperatura de 35° C. O pH tem um efeito importante sobre a eficiência da descoloração do corante. Para remoção de cor utilizando bactérias, geralmente o pH ideal está entre 6,0 e 10,0. Os efeitos do pH podem estar relacionados ao transporte da molécula de corante através da membrana celular, que é considerada o passo limitante na taxa de descoloração (KHAN et al. 2012).

A eficiência da descoloração do VC pelo consórcio bacteriano composto por isolados de *Proteus sp.* (EDS-S1, ETS-SB2), *Klebsiella sp.* (EDS-S2), *Salmonella sp.* (EDS-S3) e *Pseudomonas sp.* (ETS-SB1) foi estudada usando diferentes concentrações do corante (variando de 50 a 250 ppm). A eficiência máxima de descoloração foi observada até 200 ppm. Este consórcio bacteriano mostrou descoloração de 98% na concentração de 200 ppm, pH 7, e temperatura de 37° C. *Proteus sp.* como único inóculo apresentou descoloração de 90% na concentração de 200 ppm. Na concentração de 250 ppm de VC, a eficiência da descoloração reduziu para 20% (PERUMAL et al. 2012). Gopinath et al. (2009) relataram em seus ensaios degradação de 30% do VC com uma concentração de 3 g.L<sup>-1</sup>, utilizando uma cepa mutante de *Bacillus sp.*, em condições estáticas, pH 7,0, e temperatura de 37° C.

Os corantes azoicos são extremamente resistentes à biodegradação em condições normais, mas a ligação azo é vulnerável à clivagem redutora. Isik e Sponza (2003) estudaram a degradação anaeróbia do VC e observaram 95% de remoção de cor (GOPINATH et al. 2009). A remoção da cor é um aspecto importante, mas a produção de compostos intermediários tóxicos também deve ser considerada. A biodegradação do VC por *Pseudomonas luteola* produz aminas aromáticas (GOPINATH et al. 2009), que também foram observadas em nosso trabalho, para ambos os corantes.

A enzima lacase de *Ganoderma lucidum* foi eficiente na descoloração do VC. Depois de 6 h de incubação (concentração de 50 ppm do VC) a absorbância inicial reduziu 80% (MOTA et al. 2015). No estudo de biodegradação do VC (nas concentrações de 100, 200, 300, 400 e 500 mg.L<sup>-1</sup>) de Ning et al. (2014) com uma cepa de *Acinetobacter baumannii* YNWH 226, as condições ideais de degradação foram pH 7,0 e temperatura de 30° C sob agitação. Nas concentrações de VC variando de 100 a 500 mg.L<sup>-1</sup>, após cinco dias de incubação, a eficiência da descoloração foi de 90,37 para 63,16%. A eficiência na descoloração reduziu com o aumento da concentração do corante, mostrando que as suspensões microbianas também são sensíveis a altas concentrações do corante VC (NING et al. 2014).

Tony et al. (2009) mostraram que o consórcio dos isolados bacterianos de *B. pumilus*, *B. megaterium*, *B. cereus*, *B. vallismortis* e *B. subtilis* possuíam a capacidade de descolorir o VC, AM, *ranocid fast blue* e *blue BCC*, em concentrações variando de 10 a 100 mg/L<sup>-1</sup>, individualmente e também em consórcio. A eficiência máxima da descoloração deste consórcio foi de 94,8%, semelhante a eficiência obtida em nosso trabalho (93,6%). A taxa de descoloração foi inversamente proporcional à concentração inicial do corante, de acordo com os resultados de O'Neill et al. (1999 a, b). A descoloração do VC por *Acinetobacter baumannii* YNWH 226 demonstrou a formação dos grupos funcionais derivados de benzeno. Neste trabalho, a eficiência de remoção máxima foi de 94,69% (NING et al. 2015).

Saratale et al. (2013) identificaram as condições ótimas da descoloração de C.I. Remazol Red por um isolado bacteriano de *Lysinibacillus* sp. RGS. Os experimentos de descoloração atingiram eficiência de até 90% na faixa de pH entre 7.0 e 9.0, e temperatura entre 30° e 35° C. Assim, a descoloração microbiana e a degradação de

corantes aromáticos adquiriram um interesse considerável por pesquisadores, pois é barato, ecológico e produz menos quantidade de lodo (LALNUNHLIMI et al. 2015). Já foi relatado que muitos organismos são capazes de reduzir a concentração dos corantes, com tratamento anaeróbico, como por exemplo: *Bacteroides spp.*, *Eubacterium spp.*, *Clostridium spp.*, *Proteus vulgaris*, *Streptococcus faecalis*, *Bacillus spp.*, *Sphingomonas spp.* (LALNUNHLINI et al. 2015).

### **7.2.2 Estudo dos metabólitos gerados após a degradação do corante vermelho congo**

No estudo de degradação do corante VC podemos observar uma similaridade peculiar na formação dos compostos indol, pirrolizidina e benzidina nos três tratamentos avaliados. A degradação microbiana de compostos aromáticos sulfonados é frequentemente realizada por culturas mistas. Certas amins aromáticas e amins aromático-sulfonadas são degradadas por bactérias aeróbias. Dessa forma, foi sugerido combinar a clivagem anaeróbia dos corantes azo com um sistema de tratamento aeróbio para a degradação das amins formadas. A degradação aeróbica da anilina também foi observada usando lodo granular anaeróbico como fonte de inóculo. Amins aromáticas com um ou mais grupos OH tendem a se oxidar automaticamente na presença de oxigênio (PUVANESWARI et al. 2015). NG et al. (2014) mostraram a biodegradação do VC pela cepa de *Shewanella xiamenensis* BC01, formando o metabólito 4,4'-diamino-1,1'-bifenilo (benzidina). Em nosso trabalho, também encontramos este metabólito como produto da degradação nos três tratamentos avaliados. Lade et al. (2015) mostrou ainda a formação de mais três compostos principais: bifenil-1,4'-diamina, bifenilo e naftaleno (LADE et al. 2015).

Mota et al. (2015) relataram em ensaios de degradação do corante vermelho congo a presença dos picos  $m/z + 298$  e  $m/z + 441$ , o que permite sugerir uma hipótese para a degradação do vermelho congo nas condições do presente trabalho. Propõe-se que o primeiro passo seja uma clivagem assimétrica da ligação azo presente na estrutura do vermelho congo formando o intermediário com pico  $m/z + 298$ , e uma formação de centro deficiente em elétrons na parte restante. No entanto, muito pouco se sabe sobre a natureza dos produtos de degradação formados nessas

reações e os mecanismos de reação das enzimas oxirredutoras (SARATALE et al. 2013). A clivagem de um ou mais grupos azoicos do corante vermelho congo pode formar aminas cancerígenas, tais como benzidina (SPONZA; IŞIK 2005). O vermelho congo é um corante azo recalcitrante, o que é atribuído à presença de ligações do grupo aminobifenilo e azo, duas características geralmente consideradas xenobióticas (SPONZA; IŞIK 2005).

Um dos produtos da degradação do corante vermelho congo é a benzidina, que é tóxica para animais aquáticos e plantas, além de se acumular nos sedimentos das estações de tratamento de águas residuais (SPONZA e IŞIK 2005). Estudos recentes indicam que este corante também possui a capacidade de interferir no processo de dobramento e agregação das proteínas (FRID; ANISIMOV; POPOVIC 2007).

### **7.2.3 Estudos da toxicidade dos produtos da biodegradação do corante vermelho congo**

Muitos corantes azo e seus intermediários são tóxicos, mutagênicos e cancerígenos (SHAH et al. 2013, PUVANESWARI et al. 2006). A toxicidade dos corantes azo variam dependendo de sua complexidade estrutural, grupos de substituição e reatividade (MARAN, SILD 2003). Estudos de vários pesquisadores relataram a toxicidade de corantes sintéticos em ecossistemas contaminados (DAFALE et al. 2010, DE SÁ et al. 2009, OSUGI et al. 2009). A maioria dos corantes azo são fabricados a partir de compostos precursores que são cancerígenos conhecidos, tais como benzidina, naftaleno e outros compostos aromáticos. As aminas aromáticas são liberadas após clivagem de ligações azo por microflora contendo azoreductases (PRASAD; AIKAT 2014).

Na análise de fitotoxicidade do Remazol Red e seus metabólitos em sementes de *Phaseolus mungo* e *Sorghun vulgare*, foi demonstrado que os produtos de biodegradação não interferiram na germinação de sementes destas plantas. A taxa de germinação destas plantas foi reduzida quando tratadas com o corante *Remazol Red* 300 ppm (SARATALE et al. 2013).



O VC inibiu o crescimento hipocótilo de sementes de alface (MOTA et al. 2015). Quando tratada com a enzima lacase, o VC não inibe o crescimento desta planta. A mudança de toxicidade é um aspecto normalmente negligenciado em estudos de descoloração de corantes (DOS SANTOS BAZANELLA 2013). Neste trabalho, um comportamento inverso foi observado. O corante VC não reduziu a porcentagem de sementes de alface germinadas, mas os produtos da biodegradação apresentaram efeito inibitório na germinação.

## 8 CONCLUSÃO

Este trabalho mostrou que isolados bacterianos possuem a capacidade de descolorir os corantes amarantho e vermelho congo. Foi demonstrado pelo estudo a capacidade de remoção de cor pelos isolados mais promissores sendo utilizada a condição ideal de pH (7,5) e temperatura (35° C). Entretanto, a perda da cor não deve ser o único aspecto estudado, uma vez que a biodegradação estudada neste trabalho apresentou metabólitos mais tóxicos que o próprio corante, confirmada pelo estudo de germinação de sementes de alface. Não existem trabalhos que relatam a descoloração de corantes azo por bactérias da espécie *Citrobacter Portucalensis*, desta forma abre-se uma infinita possibilidade de estudo com este microrganismo na biodegradação de corantes, podendo haver interesse em um produto biotecnológico com este microrganismo no tratamento de efluentes provenientes da indústria de corantes.

## 9 PERSPECTIVAS

Como perspectiva, os produtos da degradação dos corantes pelos isolados estudados (1B12 e 1A32) serão avaliados após o tratamento microaerófilo e aeróbico. Esta condição será avaliada com objetivo de se obter a completa mineralização dos corantes. Também pretende-se fazer um ensaio enzimático destes isolados, já que os mesmos apresentaram ser de um gênero bacteriano descoberto recentemente. Outra possibilidade a ser estudada com o isolado *Citrobacter portucalensis* e a sua aplicação na biodegradação de outros corantes e suas combinações.

## 10 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKAR, Tamer et al. Biosorption of a textile dye (Acid Blue 40) by cone biomass of *Thuja orientalis*: estimation of equilibrium, thermodynamic and kinetic parameters. **Bioresource technology**, v. 99, n. 8, p. 3057-3065, 2008.

AKSU, Zümriye. Application of biosorption for the removal of organic pollutants: a review. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 3, p. 997-1026, 2005.

ANJANEYA, O. et al. Decolourization of Amaranth dye by bacterial biofilm in batch and continuous packed bed bioreactor. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 79, p. 64-72, 2013.

ASHFAQ, Nadia; MASUD, Tariq. Surveillance on artifical colours in different ready to eat foods. **Pakistan J Nutr**, v. 5, p. 223-225, 2002.

AXELSSON, J. et al. Decolorization of the textile dyes Reactive Red 2 and Reactive Blue 4 using *Bjerkandera* sp. Strain BOL 13 in a continuous rotating biological contactor reactor. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, n. 1, p. 32-37, 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos. Resolução n. 44, 1977. Estabelece condições gerais de elaboração, classificação, apresentação, designação, composição e fatores essenciais de qualidade dos corantes empregados na produção de alimentos e bebidas e revoga as Resoluções 20/70 e 8/72. (Ementa elaborada pelo CD/MS). **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 02 fev. 1978. Disponível em: <[http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/44\\_77.htm](http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/44_77.htm)>. Acesso, em 13 abril de 2016.

BRASIL. Ministério da Saúde. Conselho Nacional de Saúde. Resolução CNS/MS n. 04, de 24 de novembro de 1988. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 19 dez. 1988. Disponível em: <[http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/04\\_cns.pdf](http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/04_cns.pdf)>. Acesso, 15 abril de 2016.

CARMEN, Zaharia; DANIELA, Suteu. Textile organic dyes—characteristics, polluting effects and separation/elimination procedures from industrial effluents—a critical overview. In: **Organic Pollutants Ten Years After the Stockholm Convention-Environmental and Analytical Update**. InTech: Croatia, 2012. p. 55-81.

CHANG, Jo-Shu et al. Kinetic characteristics of bacterial azo-dye decolorization by

*Pseudomonas luteola*. **Water Research**, v. 35, n. 12, p. 2841-2850, 2001.

CHRISTIE, Robert. **Colour chemistry**. Royal Society of Chemistry, 2014.

DAFALE, Nishant et al. Bioremediation of wastewater containing azo dyes through sequential anaerobic–aerobic bioreactor system and its biodiversity. **Environmental Reviews**, v. 18, n. NA, p. 21-36, 2010.

DE ARAGÃO UMBUZEIRO, Gisela et al. Mutagenicity evaluation of the commercial product CI Disperse Blue 291 using different protocols of the Salmonella assay. **Food and chemical toxicology**, v. 43, n. 1, p. 49-56, 2005.

DELLAMATRICE, Priscila Maria; MONTEIRO, Regina Teresa Rosim. Isolation of diuron-degrading bacteria from treated soil. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 47, n. 6, p. 999-1003, 2004.

DE SÁ, Alves FR; BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. From nature to drug discovery: the indole scaffold as a 'privileged structure'. **Mini reviews in medicinal chemistry**, v. 9, n. 7, p. 782, 2009.

DOS SANTOS BAZANELLA, Gisele Cristina et al. Produção de lacase e peroxidase de manganês por *Pleurotus pulmonarius* em culturas de estado sólido e aplicação na descoloração de corantes. **Folia microbiologica**, v. 58, n. 6, p. 641-647, 2013.

DOWNHAM, Alison; COLLINS, Paul. Colouring our foods in the last and next millennium. **International journal of food science & technology**, v. 35, n. 1, p. 5-22, 2000.

FARACO, V. et al. Bio-remediation of colored industrial wastewaters by the white-rot fungi *Phanerochaete chrysosporium* and *Pleurotus ostreatus* and their enzymes. **Biodegradation**, v. 20, n. 2, p. 209-220, 2009.

FRID, Petrea; ANISIMOV, Sergey V.; POPOVIC, Natalija. Congo red and protein aggregation in neurodegenerative diseases. **Brain Research Reviews**, v. 53, n. 1, p. 135-160, 2007.

GOMES, Jaime Rocha. **Estrutura e propriedades dos corantes**. 2001.

GOMES, Keiva Maria Silva et al. Citotoxicity of food dyes sunset yellow (E-110), bordeaux red (E-123), and tartrazine yellow (E-102) on *Allium cepa* L. root meristematic cells. **Food Science and Technology (Campinas)**, v. 33, n. 1, p. 218-223, 2013.

GOPINATH, Kannappan Panchamoorthy et al. *Bacillus* sp. mutant for improved biodegradation of Congo red: random mutagenesis approach. **Bioresource technology**, v. 100, n. 24, p. 6295-6300, 2009.

GROWTHER, Lali; MEENAKSHI, M. Biotechnological approaches to combat textile effluents. **ChemInform**, v. 42, n. 29, 2011.

GUERRERO-CORONILLA, Imelda et al. BIOSORPTION OF AMARANTH DYE FROM AQUEOUS SOLUTION. **Environmental Engineering and Management Journal**, v. 13, n. 8, p. 1917-1926, 2014.

GUPTA, V. K. et al. Application of low-cost adsorbents for dye removal—A review. **Journal of environmental management**, v. 90, n. 8, p. 2313-2342, 2009.

GÜRSES, Ahmet et al. Dyes and Pigments: Their Structure and Properties. In: **Dyes and Pigments**. Springer International Publishing, 2016. p. 13-29. JANG, Moon-Sun et al. Decolorization of textile plant effluent by *Citrobacter* sp. strain KCTC 18061P. **The Journal of general and applied microbiology**, v. 53, n. 6, p. 339-343, 2007.

GÜRSES, Ahmet et al. Classification of dye and pigments. In: **Dyes and Pigments**. Springer International Publishing, 2016. p. 31-45.

HADIBARATA, Tony; NOR, Nurafifah Mohd. Decolorization and degradation mechanism of Amaranth by *Polyporus* sp. S133. **Bioprocess and biosystems engineering**, v. 37, n. 9, p. 1879-1885, 2014.

HALABURGI, Vijayakumar; KAREGOUDAR, Timmanagouda. Oxidative degradation of Amaranth dye by a new genus *Kerstesia* sp. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 34, n. 6, p. 265-271, 2016.

IŞIK, Mustafa; TERESA SPONZA, Delia. Aromatic amine degradation in a UASB/CSTR sequential system treating Congo Red dye. **Journal of Environmental Science and Health, Part A**, v. 38, n. 10, p. 2301-2315, 2003.

JADHAV, Shekhar B. et al. Batch and continuous biodegradation of Amaranth in plain distilled water by *P. aeruginosa* BCH and toxicological scrutiny using oxidative stress studies. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 20, n. 5, p. 2854-2866, 2013.

JALALULDEEN, Anfal Muayad et al. Growth characteristics and production of secondary metabolites from selected *Streptomyces* species isolated from the Rhizosphere of Chili Plant. **Growth**, v. 4, n. 1, 2015.

JANG, Moon-Sun et al. Decolorization of textile plant effluent by *Citrobacter* sp. strain KCTC 18061P. **The Journal of general and applied microbiology**, v. 53, n. 6, p. 339-343, 2007.

KHAN, Razia; BHAWANA, P.; FULEKAR, M. H. Microbial decolorization and degradation of synthetic dyes: a review. **Reviews in Environmental Science and Bio/Technology**, v. 12, n. 1, p. 75-97, 2013.

KHAN, Sana; MALIK, Abdul. Environmental and health effects of textile industry wastewater. In: **Environmental Deterioration and Human Health**. Springer Netherlands, 2014. p. 55-71.

KOBYLEWSKI, Sarah; JACOBSON, Michael F. Toxicology of food dyes. **International journal of occupational and environmental health**, v. 18, n. 3, p. 220-246, 2012.

LADE, Harshad et al. Biodegradation and detoxification of textile azo dyes by bacterial consortium under sequential microaerophilic/aerobic processes. **EXCLI journal**, v. 14, p. 158, 2015.

LALNUNHLIMI, Sylvine; KRISHNASWAMY, Veenagayathri. Decolorization of azo

dyes (Direct Blue 151 and Direct Red 31) by moderately alkaliphilic bacterial consortium. **brazilian journal of microbiology**, v. 47, n. 1, p. 39-46, 2016.

LIN, Yen-Hui; LEU, Jyh-Yih. Kinetics of reactive azo-dye decolorization by *Pseudomonas luteola* in a biological activated carbon process. **Biochemical Engineering Journal**, v. 39, n. 3, p. 457-467, 2008.

MAHMOOD, Shahid et al. Detoxification of azo dyes by bacterial oxidoreductase enzymes. **Critical reviews in biotechnology**, v. 36, n. 4, p. 639-651, 2016.

MARAN, Uko; SLID, Sulev. Modelagem QSAR de genotoxicidade em conjuntos não-congêneres de compostos orgânicos. **Artificial Intelligence Review**, v. 20, n. 1, p. 13-38, 2003.

MENDONÇA, Jacqueline Nakau. **Identificação e isolamento de corantes naturais produzidos por actinobactérias**. 2011. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2011. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/59/59138/tde-29092011-145108/pt-br.php>>. Acesso, 26 abril 2016.

MOHAMMADI, Abbas; DAEMI, Hamed; BARIKANI, Mehdi. Fast removal of malachite green dye using novel superparamagnetic sodium alginate-coated Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles. **International journal of biological macromolecules**, v. 69, p. 447-455, 2014.

MOTA, Thatiane Rodrigues et al. Decolourization of Congo Red by *Ganoderma lucidum* Laccase: Evaluation of Degradation Products and Toxicity. **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 226, n. 10, p. 1-11, 2015.

MORALES-GONZÁLEZ, José A. Estresse oxidativo e doenças degenerativas crônicas - um papel para os antioxidantes. **Rijeka: Croácia InTech**, v. 500, 2013.

MPOUNTOUKAS, Panagiotis et al. Cytogenetic evaluation and DNA interaction studies of the food colorants amaranth, erythrosine and tartrazine. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, n. 10, p. 2934-2944, 2010.

National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database; CID= 11313, <https://pubchem.ncbi.nlm.gov/compound/11313> (acesado em 06 de julho de 2016).

NG, I.-Son et al. Decolorization of textile azo dye and Congo red by an isolated strain of the dissimilatory manganese-reducing bacterium *Shewanella xiamenensis* BC01. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 98, n. 5, p. 2297-2308, 2014.

NING, Xun-an et al. Decolorization and biodegradation of the azo dye Congo red by an isolated *Acinetobacter baumannii* YNWH 226. **Biotechnology and bioprocess engineering**, v. 19, n. 4, p. 687-695, 2014.

OLIVEIRA, G. A. R. et al. Chlorination treatment of aqueous samples reduces, but does not eliminate, the mutagenic effect of the azo dyes Disperse Red 1, Disperse Red 13 and Disperse Orange 1. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 703, n. 2, p. 200-208, 2010.

O'NEILL, Cliona et al. Colour in textile effluents—sources, measurement, discharge consents and simulation: a review. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 74, n. 11, p. 1009-1018, 1999.

O'NEILL, C. et al. Azo-dye degradation in an anaerobic-aerobic treatment system operating on simulated textile effluent. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 53, n. 2, p. 249-254, 2000.

O'NEILL, MJ (ed.). O índice Merck – Uma enciclopédia de substâncias química, drogas e produtos biológicos. Whitehouse Station, NJ: Merck and Co., Inc., 2006, p. 64.

OSUGI, Marly E. et al. Comparação da eficiência de oxidação de corantes dispersos por cloração química e fotoeletrocatalítica e remoção da atividade mutagênica. **Electrochimica Acta**, v. 54, n. 7, p. 2086-2093, 2009.

PANDEY, Anjali; SINGH, Poonam; IYENGAR, Leela. Bacterial decolorization and degradation of azo dyes. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 59, n. 2, p. 73-84, 2007.

PEPLING, M.; HOWARD, P. H.; DURKIN, P. R. Use and Assessment of Marker Dyes Used With Herbicides. 1997.

PERUMAL, K. et al. Decolourization of Congo Red dye by bacterial consortium isolated from dye contaminated soil, Paramakudi, Tamil Nadu. **Journal of Microbiology and Biotechnology Research**, v. 2, n. 3, p. 475-480, 2017.

PRADO, Marcelo Alexandre; GODOY, Helena Teixeira. Corantes artificiais em alimentos. **Alimentos e Nutrição Araraquara**, v. 14, n. 2, 2009.

PRASAD, Shiv Shankar; AIKAT, Kaustav. Optimization of medium for decolorization of Congo red by *Enterobacter* sp. SXCR using response surface methodology. **Desalination and Water Treatment**, v. 52, n. 31-33, p. 6166-6174, 2014.

POUL, Martine et al. Lack of genotoxic effect of food dyes amaranth, sunset yellow and tartrazine and their metabolites in the gut micronucleus assay in mice. **Food and chemical toxicology**, v. 47, n. 2, p. 443-448, 2009.

PUVANESWARI, N.; MUTHUKRISHNAN, J.; GUNASEKARAN, P. Toxicity assessment and microbial degradation of azo dyes. 2006.

RAJAGURU, P. et al. Biodegradation of azo dyes in a sequential anaerobic–aerobic system. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 54, n. 2, p. 268-273, 2000.

RAVAL, Nirav P.; SHAH, Prapti U.; SHAH, Nisha K. Adsorptive amputation of hazardous azo dye Congo red from wastewater: a critical review. **Environmental Science and Pollution Research**, p. 1-44, 2016.

ROBINSON, Tim et al. Remediation of dyes in textile effluent: a critical review on current treatment technologies with a proposed alternative. **Bioresource technology**, v. 77, n. 3, p. 247-255, 2001.



SAMBROOK, Joseph; RUSSELL, David W. Molecular cloning: a laboratory manual 3rd edition. **Coldspring-Harbour Laboratory Press, UK**, 2001.

SANDHYA, S. Biodegradation of azo dyes under anaerobic condition: role of azoreductase. In: **Biodegradation of azo dyes**. Springer Berlin Heidelberg, 2010. p. 39-57.

SARATALE, Rijuta Ganesh et al. Bacterial decolorization and degradation of azo dyes: a review. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 42, n. 1, p. 138-157, 2011.

SARATALE, Rijuta G. et al. Decolorization and detoxification of sulfonated azo dye CI Remazol Red and textile effluent by isolated *Lysinibacillus* sp. RGS. **Journal of bioscience and bioengineering**, v. 115, n. 6, p. 658-667, 2013.

SARIKAYA, Rabia; SELVI, Mahmut; ERKOÇ, Figen. Evaluation of potential genotoxicity of five food dyes using the somatic mutation and recombination test. **Chemosphere**, v. 88, n. 8, p. 974-979, 2012.

SARON, Clodoaldo; FELISBERTI, Maria Isabel. Ação de colorantes na degradação e estabilização de polímeros. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 124, 2006.

SARWAN, Bhawna et al. Mineralization and toxicity reduction of textile dye neutral red in aqueous phase using BiOCl photocatalysis. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 116, p. 48-55, 2012.

SER, Hooi-Leng et al. Presence of antioxidative agent, Pyrrolo [1, 2-a] pyrazine-1, 4-dione, hexahydro-in newly isolated *Streptomyces mangrovisoli* sp. nov. **Frontiers in microbiology**, v. 6, 2015.

SHAH, M. Effective treatment systems for azo dye degradation: a joint venture between physico-chemical & microbiological process. **International Journal of Environmental Bioremediation & Biodegradation**, v. 2, n. 5, p. 231-242, 2014.

SINGH, Ram Lakhan; SINGH, Pradeep Kumar; SINGH, Rajat Pratap. Enzymatic decolorization and degradation of azo dyes—A review. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 104, p. 21-31, 2015.

SPONZA, Delia Teresa; IŞIK, Mustafa. Toxicity and intermediates of CI Direct Red 28 dye through sequential anaerobic/aerobic treatment. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 8, p. 2735-2744, 2005.

SOLÍS, Myrna et al. Microbial decolouration of azo dyes: a review. **Process Biochemistry**, v. 47, n. 12, p. 1723-1748, 2012.

SUTEU, Daniela et al. Decolorization waste waters from the textile industry-physical methods, chemical methods. **Industria Textila**, v. 60, n. 5, p. 254-263, 2009.

TELKE, Amar A. et al. Decolorization and detoxification of Congo red and textile industry effluent by an isolated bacterium *Pseudomonas* sp. SU-EBT. **Biodegradation**, v. 21, n. 2, p. 283-296, 2010.

TONY, Bella Devassy; GOYAL, Dinesh; KHANNA, Sunil. Decolorization of textile azo dyes by aerobic bacterial consortium. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 63, n. 4, p. 462-469, 2009.

TONY, Bella Devassy; GOYAL, Dinesh; KHANNA, Sunil. Decolorization of Direct Red 28 by mixed bacterial culture in an up-flow immobilized bioreactor. **Journal of industrial microbiology & biotechnology**, v. 36, n. 7, p. 955-960, 2009.

TRIPATHI, A.; SRIVASTAVA, S. K. Biodegradation of orange G by a novel isolated bacterial strain *Bacillus megaterium* ITBHU01 using response surface methodology. **African Journal of Biotechnology**, v. 11, n. 7, p. 1768-1781, 2012.

TSAL, Wen-Tien; CHEN, Huei-Ru. Removal of malachite green from aqueous solution using low-cost chlorella-based biomass. **Journal of Hazardous Materials**, v. 175, n. 1, p. 844-849, 2010.

VIJAYKUMAR, M. H. et al. Decolourization of naphthalene-containing sulfonated azo dyes by *Kerstersia* sp. strain VKY1. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, n. 2, p. 204-211, 2007.

WELHAM, Arthur. The theory of dyeing (and the secret of life). **Journal of the Society of Dyers and Colourists**, v. 116, n. 5, p. 140-3, 2000.

WU, Yonghong; LI, Tianling; YANG, Linzhang. Mechanisms of removing pollutants from aqueous solutions by microorganisms and their aggregates: a review. **Bioresource technology**, v. 107, p. 10-18, 2012.

YAGUB, Mustafa T.; SEN, Tushar Kanti; ANG, H. M. Equilibrium, kinetics, and thermodynamics of methylene blue adsorption by pine tree leaves. **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 223, n. 8, p. 5267-5282, 2012.

YANG, Xiu Qing et al. Decolorization of azo, triphenylmethane and anthraquinone dyes by a newly isolated *Trametes* sp. SQ01 and its laccase. **Process Biochemistry**, v. 44, n. 10, p. 1185-1189, 2009.

ZAHARIA, Carmen et al. Textile wastewater treatment by homogenous oxidation with hydrogen peroxide. **Environmental Engineering and Management Journal**, v. 8, n. 6, p. 1359-1369, 2009.

ZAHARIA, Carmen; SUTEU, Daniela; MURESAN, Augustin. Options and solutions for textile effluent decolorization using some specific physico-chemical treatment steps. **Environmental Engineering and Management Journal**, v. 11, n. 2, p. 493-509, 2012.

ZOLLINGER, Heinrich. **Color chemistry: syntheses, properties, and applications of organic dyes and pigments**. John Wiley & Sons, 2003.